

**Determinação dos antibióticos
enrofloxacin, ciprofloxacin e
norfloxacin em farinha de aves ou penas
por extração assistida por micro-ondas
(MAE) seguida de cromatografia líquida
RPLC-DAD ou HILIC-MS/MS**

Telmo José Anselmo Francisco

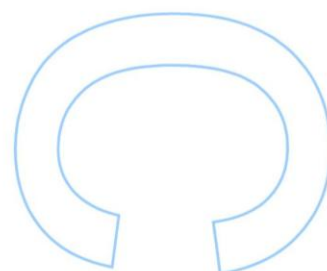
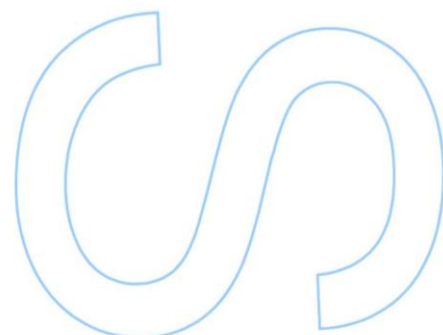
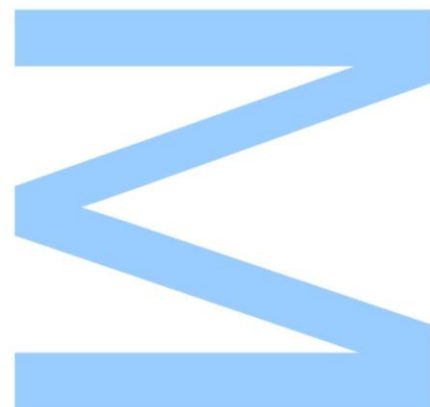
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica
2016

Orientadora

Mafalda Baptista, Investigadora
FCUP/CIIMAR

Co-orientadora

Maria Clara Basto, Professor Auxiliar
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





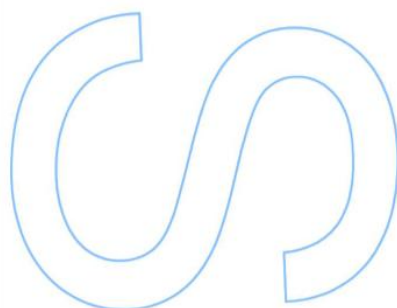
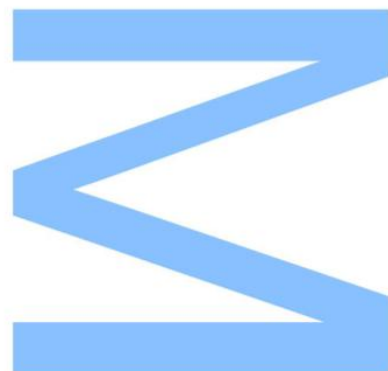
Universidade do Minho



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



"Sê como as ondas do mar
que mesmo quebrando contra
os obstáculos, encontram força
para... recomeçar."

Eduarda Santos

Agradecimentos

Agradeço à Doutora Mafalda Baptista, pelo apoio e amabilidade com que me recebeu no seu grupo de trabalho e investigação, pela oportunidade que me concedeu ao permitir-me realizar este trabalho, pela valiosa dedicação durante a realização do mesmo e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Professora Doutora Maria Clara Basto pela paciência e apoio prestado, pela inserção no grupo de investigação, bem como pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a orientação, assim como pelos momentos mais descontraídos que proporcionou.

À Doutora Marisa Almeida com quem outrora tive oportunidade de trabalhar, pelo apoio e por me ter sugerido este trabalho de investigação.

À Doutora Elisabete Matos, pela disponibilidade demonstrada e por sugestões de melhoria do trabalho.

À Sílvia, técnica do CEMUP, pela ajuda no desenvolvimento do método no espectrómetro de massa.

Ao Professor Doutor Victor Freitas e ao Professor Doutor Nuno Mateus pelo apoio e dedicação demonstrados durante o período do mestrado.

Agradece-se o financiamento através do projeto “IJUP EMPRESAS (PP-IJUP2014-SOJA DE PORTUGAL-15) e do Fundo Estratégico UID/Multi/04423/2013 através de fundos nacionais provenientes da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Ao Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pela utilização das instalações.

À Cristiana Silva e ao Alfredo Esteves, meus colegas de trabalho no laboratório, que desempenharam um papel fulcral no decorrer destes meses de trabalho.

À minha família pelo apoio, dedicação, pela força e carinho que sempre demonstraram ao estarem a meu lado durante as etapas mais difíceis.

Por fim, um especial obrigado aos meus amigos, por todos os bons momentos que me proporcionaram e a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Determinação dos antibióticos enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin em farinha de aves ou penas por extração assistida por micro-ondas (MAE) seguida de cromatografia líquida RPLC-DAD ou HILIC-MS/MS

Resumo

Este trabalho teve como objetivo a otimização de processos para determinação dos antibióticos enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin em farinha de aves e penas, utilizadas em rações compostas por restos de animais que não são comercializados ao público. As farinhas foram processadas recorrendo a extração assistida por micro-ondas (MAE) e a extração por fase sólida (SPE). Para deteção e quantificação de antibióticos foram utilizadas cromatografia líquida de fase reversa acoplada a um detetor de díodos (RPLC-DAD) e cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a um detetor de díodos (HILIC-DAD) ou a espectrometria de massa em tandem (HILIC-MS/MS).

Recorrendo a RPLC-DAD verificou-se que as condições optimizadas para MAE consistiram no uso de metanol/ácido fórmico (95:5 v/v), a 30 °C, durante 15 minutos.

Recorrendo a HILIC-DAD verificou-se que as condições optimizadas de SPE consistiram na utilização de cartuchos Oasis HLB (60 mg, 3 mL), com eluição final da amostra em metanol. Para além disso, este método permitiu optimizar os eluentes utilizados, sendo acetonitrilo e acetato de amónio 5 mM a pH 3,5 escolhidos como os mais adequados.

A utilização dos processos optimizados com HILIC-MS/MS mostrou que o método era específico para a determinação de enrofloxacin, em farinha de aves, sendo a precisão de 11 a 18% e a exatidão de 103 a 121%, para amostras dopadas antes de MAE com uma concentração superior a 37 µg/kg, sendo este valor considerado como o limite de quantificação (LOQ). O método foi considerado específico para a deteção e monitorização de enrofloxacin, encontrando-se o valor de LOQ abaixo do limite máximo residual permitido para este antibiótico, em tecidos de origem animal para consumo humano. A análise de amostras de farinha de aves confirmou a presença de enrofloxacin em concentrações não quantificáveis.

Palavras-chave: antibióticos, enrofloxacin, extração assistida por micro-ondas, extração por fase sólida, cromatografia líquida de fase reversa, cromatografia por interação hidrofílica, espectrometria de massa

Determinação dos antibióticos enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin em farinha de aves ou penas por extração assistida por micro-ondas (MAE) seguida de cromatografia líquida RPLC-DAD ou HILIC-MS/MS

Abstract

This work aimed to optimize processes for determination of enrofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in poultry or feathers meals (composed of animal remains that are not sold to the public). Meals were processed by microwave assisted extraction (MAE) and solid phase extraction (SPE). Reverse phase liquid chromatography coupled to a diode detector (RPLC-DAD) and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to a diode detector (HILIC-DAD) or tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) were used for detection and quantification of antibiotics.

Using RPLC-DAD it was found that the best conditions for MAE consisted in using methanol/formic acid (95:5 v/v) at 30 °C for 15 minutes.

Using HILIC-DAD it was found that the best SPE conditions consisted in using Oasis HLB cartridges (60 mg, 3 mL) with final elution of the sample in methanol. Additionally, this method allowed optimizing the eluent used, being acetonitrile and ammonium acetate 5 mM pH 3.5 chosen as the most suitable.

The use of optimized process with HILIC-MS/MS showed that the method was specific for the determination of enrofloxacin in poultry meals, with precision ranging from 11 to 18% and accuracy from 103 to 121%, in spiked samples before MAE with a concentration greater than 37 µg/kg, being this value the limit of quantification (LOQ). This method was considered to be specific for detection and monitoring of enrofloxacin. The LOQ value is below the maximum residue limit for this antibiotic in animal tissues for human consumption. The analysis of samples of poultry meals showed the presence of enrofloxacin at values below the LOQ.

key words: antibiotics, enrofloxacin, microwave assisted extraction, solid phase extraction, reversed phase liquid chromatography, hydrophilic interaction chromatography, mass spectrometry

Determinação dos antibióticos enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin em farinha de aves ou penas por extração assistida por micro-ondas (MAE) seguida de cromatografia líquida RPLC-DAD ou HILIC-MS/MS

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	XI
Lista de Abreviaturas	XIII
 1. Introdução	 1
1.1 Perspetiva histórica dos antibióticos	1
1.2 Antibióticos	1
1.2.1 Classificação dos antibióticos	1
1.2.2 Alvo e mecanismo de ação	3
1.2.3 Resistência bacteriana a antibióticos	5
1.3 Antibióticos Veterinários	6
1.3.1 Legislação geral	7
1.3.2 Limites máximos de resíduos	7
1.3.3 Mercado e consumo de antibióticos	8
1.4 Quinolonas	9
1.4.1 Propriedades físico-químicas	13
1.4.2 Mecanismo de ação	14
1.4.3 Mecanismo de resistência	15
1.5 Metodologias analíticas para extração, deteção e quantificação de antibióticos veterinários	15
1.5.1 Extração e purificação	16
1.5.1.1 Extração assistida por micro-ondas	17
1.5.1.2 Extração em fase sólida	17
1.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	19
1.5.3 Cromatografia líquida por interação hidrofílica	19
1.5.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.....	21

2. Objetivo	23
3. Materiais e métodos	23
3.1 Materias e Reagentes	23
3.2 Padrões de antibióticos	24
3.3 Amostras	24
3.4 Extração assistida por micro-ondas	24
3.5 Extração em fase sólida	25
3.6 Cromatografia líquida de fase reversa acoplada a um detetor de díodos ..	26
3.7 Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a um detetor de díodos	27
3.8 Optimização do método de extração e das condições cromatográficas recorrendo a cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massa	28
3.9 Análise estatística	29
4 Resultados e discussão	30
4.1 Cromatografia líquida de fase reversa com detetor DAD	30
4.2 Cromatografia líquida por interação hidrofílica com detetor DAD	37
4.3 Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massa	38
4.3.1 Padrões de antibiótico	41
4.3.2 Padrões de antibiótico em farinha	41
4.3.3 Exatidão e precisão	43
4.3.4 Análise das amostras de farinha	45
5. Conclusão e perspectivas futuras	46
6. Referências Bibliográficas	48

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do ácido nalidíxico.	10
Figura 2 - Estrutura química da norfloxacin.	11
Figura 3 - Estrutura química da enrofloxacin.	11
Figura 4 - Estrutura química da ciprofloxacin.	12
Figura 5 - Esquema de um espectrómetro de massa híbrido, LTQ-Orbitrap.	22
Figura 6 - Estrutura interna do analisador de massa Orbitrap.	22
Figura 7 A: Cromatograma típico de um extrato de farinha de aves não dopado. B: Cromatograma típico da mesma amostra após adição de padrão antes da injeção no cromatógrafo. Norfloxacin (1), Ciprofloxacin (2) e Enrofloxacin (3). Tempos de retenção: (1) 10,4 minutos; (2): 10,6 minutos; (3): 11,1 minutos. A concentração da amostra contendo norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin é 1 mg L ⁻¹	31
Figura 8 - A: Cromatograma típico de um extrato de farinha de penas não dopado. B: Cromatograma típico da mesma amostra após adição de padrão antes da injeção no cromatógrafo. Norfloxacin (1), Ciprofloxacin (2) e Enrofloxacin (3). Tempos de retenção: (1) 10,4 minutos; (2): 10,6 minutos; (3): 11,1 minutos. A concentração da amostra contendo norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin é 1 mg L ⁻¹	32
Figura 9 - Reta de calibração da norfloxacin extraída de farinha de aves em função da concentração (mg L ⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L ⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).	33
Figura 10 - Reta de calibração da ciprofloxacin extraída de farinha de aves em função da concentração (mg L ⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L ⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).	33
Figura 11 - Reta de calibração da enrofloxacin extraída de farinha de aves em função da concentração (mg L ⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L ⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).	34
Figura 12 - Reta de calibração da norfloxacin extraída de farinha de penas em função da concentração (mg L ⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L ⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).	34

Figura 13 - Reta de calibração da ciprofloxacin extraída de farinha de penas em função da concentração (mg L^{-1}) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L^{-1}) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).	34
Figura 14 - Reta de calibração da enrofloxacin extraída de farinha de penas em função da concentração (mg L^{-1}) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L^{-1}) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).	35
Figura 15 - Percentagens de recuperação de antibióticos obtidas usando farinha de aves dopada com uma concentração de 0,5 mg/Kg . Norfloxacin 66±10%; Ciprofloxacin 55±12% e Enrofloxacin 78±3%. (barras de erro apresentadas (n=5)).....	36
Figura 16 - Percentagens de recuperação de antibióticos obtidas usando farinha de penas dopada com uma concentração de 0,5 mg/Kg . Norfloxacin 80±5%; Ciprofloxacin 74±5% e Enrofloxacin 87±7%. (barras de erro apresentadas (n=5)).	36
Figura 17 - A: Espectro de massa da enrofloxacin após ionização; B: Espectro de massa da enrofloxacin após fragmentação em modo MRM (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>); C: Espectro de massa do padrão interno, roxitromicina, após ionização.	39
Figura 18 - Reta de calibração para a determinação de enrofloxacin na matriz de farinha de aves (50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) (barras de erro apresentadas (n=5)).....	41
Figura 19 - Cromatogramas de um extrato de farinha de aves dopado, após o processo de extração, com 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de enrofloxacin.	42
Figura 20 - Cromatogramas de um extrato de farinha de aves não dopado antes do processo de extração.	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais classes de antibióticos.	2
Tabela 2 - Tipos de processos metabólicos afetados por alguns antibióticos utilizados na prática médica.	5
Tabela 3 - Vendas de fluoroquinolonas e quinolonas em alguns países da União Europeia.	9
Tabela 4 - Classificação das quinolonas utilizadas na medicina humana.	13
Tabela 5 - Classificação das quinolonas permitidas na UE para uso veterinário.	13
Tabela 6 - Valores de pKa1 e pKa2 associados às constantes de dissociação e propriedades físico-químicas da enrofloxacin e ciprofloxacin.	14
Tabela 7 - Características de farinhas obtidas a partir de aves e penas.	24
Tabela 8 - Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).	30
Tabela 9 - Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para a farinha de aves.	35
Tabela 10 - Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para a farinha de penas.	35
Tabela 11 - Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).	37
Tabela 12 - Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).	41
Tabela 13 - Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). (n=5).	42
Tabela 14 - Exatidão e precisão para quatro níveis de concentração de enrofloxacin, com dopagem depois do processo de extração.	43
Tabela 15 - Exatidão e precisão para quatro níveis de concentração de enrofloxacin, com dopagem antes do processo de extração.	44

Abreviaturas

A

ACN - Acetonitrilo

C

CEMUP - Centro de Materiais da Universidade do Porto

CIP - Ciprofloxacina

CV - Coeficiente de variação

D

DGAV - Direção Geral da Agricultura e Veterinária

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DRA - Direção Regional da Agricultura

E

EMA - *European Medicine Agency*

ENR - Enrofloxacina

EPA - *Environmental Protection Agency*

ESAC - *European Surveillance of Antimicrobial Consumption*

F

FQ's - Fluoroquinolonas

H

HILIC - Cromatografia líquida por interação hidrofílica

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

L

LC - Cromatografia líquida

LMR's - Limite máximo de resíduos

LQT - *Linear Trap Quadrupole*

M

MAE - Extração assistida por micro-ondas

MS - Espectrometria de massa

N

NOR - Norfloxacin

P

PAH's - Hidrocarbonetos poliaromáticos

R

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

S

SPE - Extração em fase sólida

U

UE - União Europeia

1. Introdução

1.1 Perspetiva histórica dos antibióticos

Na antiguidade, as doenças foram muitas vezes relacionadas com crenças religiosas ou com o ambiente, acreditando-se que poderiam ser causadas por diversos fatores tanto naturais como sobrenaturais. Foi sempre essencial para a medicina tentar descobrir compostos com capacidade para combater as fortes epidemias que dizimavam as populações (Canesqui, 2003).

A utilização de compostos naturais, com capacidade para tratar diversas doenças, foi reportada desde o século XVI. Por exemplo, *Thomas Sydenham*, conhecido como o “Hipócrates Inglês”, utilizou a casca da cinchona no tratamento da malária, descobrindo-se mais tarde que a quinina era o composto responsável pelo efeito terapêutico. Apenas no século XIX é que as bactérias foram consideradas agentes etiológicos de diversas doenças infecciosas. Iniciou-se, assim, a procura de procedimentos terapêuticos adequados, assim como medidas preventivas, diminuindo as taxas de mortalidade e morbilidade em todo o mundo.

Em 1928, a descoberta, por acaso, da penicilina revolucionou a história da medicina. *Sir Alexander Fleming* observou que as colónias de *Staphylococcus* não cresciam em zonas contaminadas com o fungo *Penicillium*. Este teria capacidade para inibir o crescimento bacteriano, através da substância antiestafilocócica que produzia, conhecida posteriormente como penicilina (Ligon, 2004).

A primeira definição geral para o termo antibiótico foi proposta por *Selman Abraham Waksman*, considerado por alguns o “pai dos antibióticos” (Kresge *et al*, 2004) que afirmava que antibiótico era qualquer classe de moléculas orgânicas que inibiam ou matavam micróbios por interações específicas com alvos bacterianos, mas sem qualquer consideração sobre a sua fonte ou classe em particular.

1.2 Antibióticos

1.2.1 Classificação dos antibióticos

A classificação dos antibióticos sob diferentes aspetos é muito importante para agrupar os compostos, em desenvolvimento e os utilizados na prática médica, de

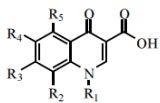
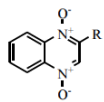
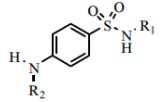
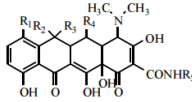
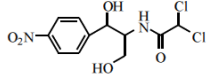
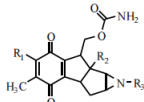
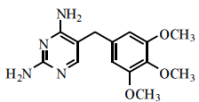
acordo com suas principais características. Estas características são a estrutura química do composto, o mecanismo de ação e o espectro de ação destes antibióticos.

Na Tabela 1 encontram-se descritas as principais classes de antibióticos de acordo com a sua estrutura química.

Tabela 1 Principais classes de antibióticos. (Adaptado de (Tavares, 2009)).

Classes de Antibióticos	Estrutura Principal
Aminoglicosídeos	Consistem em 2 ou mais açúcares aaminados unidos por uma ligação glicosídica à hexose do núcleo central do fármaco.
Antraciclinas	Estruturalmente são tetraciclinas glicosiladas.
β-Lactâmicos:	
Carbapenémicos	Estruturalmente são muito similares às penicilinas, mas o átomo de enxofre contido na estrutura foi substituído por um átomo de carbono.
Cefalosporinas	Possuem um núcleo cefem ao qual duas cadeias laterais estão ligadas: uma esterifica o grupo carbamato (R_1) e a outra está ligada ao núcleo (R_3).
Monobactâmicos	Nestes compostos, o anel β-lactâmico está sozinho e não ligado a um outro anel.
Penicilinas	Consistem num anel de tiazolidina ligado a um anel β-lactâmico, ao qual uma cadeia lateral está ligada.
Glicopeptídeos	São compostos por moléculas de hidratos de carbono (glicanos) covalentemente ligadas à cadeia lateral de um aminoácido.
Imidazóis	São compostos heterocíclicos com um anel de 5 membros, com 2 átomos de azoto em posições não adjacentes. Se $R_2=NO_2$, então é uma nitroimidazol.
Lincosamidas	Constituem uma pequena família de antibióticos que possuem uma estrutura do tipo-carbohidratos.
Macrólidos	Lactonas monocíclicas substituídas, com um ou mais sacarídeos glicosidicamente ligados a grupos hidroxilo. Os anéis das lactonas são geralmente de 12, 14 ou 16 membros.
Poliéteres	São caracterizados por diversos anéis de tetra-hidrofurano e tetra-hidropirano ligados por pontes alifáticas, ligações diretas C-C ou ligações <i>spiro</i> . Possuem também grupos carbonilo livres, vários grupos alquila e diversos grupos funcionais contendo oxigénio.

Tabela 1 (continuação) Principais classes de antibióticos. (*Adaptado de (Tavares, 2009)*).

Polipeptídeos	Polímeros formados através da ligação a aminoácidos.	
Quinolonas	Na sua estrutura possuem 2 anéis fundidos contendo um grupo cetona e ácido carboxílico. Se $R_4=F$ será uma fluoroquinolona.	
Derivados de Quinoxalina	Possuem na sua estrutura um anel benzénico e um anel derivado de pirazina.	
Sulfonamidas	São caracterizados por grupos sulfonil ligados a grupos amino.	
Tetraciclinas	Estes antibióticos contêm um esqueleto central de 4 anéis fundidos, derivado do octa-hidronaftaceno.	
Outros Antibióticos:		
Cloranfenicol	Contém uma molécula de nitrobenzeno ligada a um grupo propanodiol, bem como um grupo amida diclorada.	
Mitomicinas	Possuem uma estrutura química única, na qual 3 grupos funcionais diferentes – aziridina, carbamato e quinona – estão organizados em torno de um núcleo pirro[1,2-a]indol.	
Trimetoprim	É uma diaminopirimidina. Possui uma estrutura análoga à pteridina do ácido fólico.	

Os antibióticos em estudo neste trabalho são as fluoroquinolonas norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin, pertencentes ao grupo das quinolonas.

1.2.2 Alvo e mecanismo de ação

A classificação dos antibióticos segundo o espectro de ação (espectro de atividade) diz respeito à ação predominante em relação aos grupos de bactérias sobre os quais os antibióticos atuam (Tavares, 2009). Nesse sentido os antibióticos podem ser:

- Antibióticos ativos sobre bactérias Gram-positivas
- Antibióticos ativos sobre bactérias Gram-negativas
- Antibióticos ativos sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
- Antibióticos ativos sobre micobactérias
- Antibióticos ativos sobre riquetsias, micoplasmas e clamídias
- Antibióticos ativos sobre espiroquetas

Esta classificação, embora muito utilizada na medicina, é bastante limitada, pois muitos antibióticos apresentam atividade contra algumas espécies do espectro de ação apenas em concentrações muito elevadas. Por exemplo, alguns antibióticos considerados ativos sobre bactérias Gram-negativas apresentam atividade sobre estafilococos e bactérias Gram-positivas. Outro exemplo são os antibióticos de amplo-espectro que nem sempre são eficazes sobre grande número de germes pois sofrem efeitos limitadores da resistência bacteriana (Tavares, 2009).

Os antibióticos podem provocar dois tipos de efeitos sobre as bactérias sensíveis: a morte das bactérias (bactericidas) ou interrupção do seu crescimento e reprodução (bacteriostáticos). Estes efeitos são determinados por mecanismos de ação dos fármacos sobre a bactéria e variam de acordo com a concentração do antibiótico (Tavares, 2009). Entender o mecanismo de ação dos antibióticos é essencial para saber como e por que é que estes compostos perdem a sua eficácia (Walsh, 2000).

Além disso, a descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos com novos mecanismos de ação é a melhor forma para o combate de infeções por bactérias multirresistentes (Bragonzi, 2010).

Os antibióticos mais relevantes na prática médica afetam essencialmente cinco processos metabólicos importantes da bactéria: a síntese da parede celular, a síntese de proteínas, a replicação do DNA e a transcrição para o RNA, a síntese de ácido fólico e a membrana citoplasmática (Walsh *et al*, 2014). Na Tabela 2 estão alguns exemplos de antibióticos mais utilizados na prática médica e quais os processos metabólicos que estes afetam.

Tabela 2 Tipos de processos metabólicos afetados por alguns antibióticos utilizados na prática médica. (*Adaptado de (Tavares, 2009)*).

Inibidores da síntese da parede celular	Inibidores da membrana plasmática	Inibidores da síntese proteica	Inibidores da síntese de ácidos nucleicos	Inibidores dos processos metabólicos
β-lactâmicos	Polimixinas	Aminoglicosídeos	Rifampicina	Sulfonamidas
Bacitracina		Tetraciclina	Metronidazol	
Glicopeptídeos	Daptomicina	Cloranfenicol	Quinolonas	
		Macrólidos		

1.2.3 Resistência bacteriana a antibióticos

O aparecimento de bactérias resistentes é inevitável, podendo demorar meses ou anos a surgir a resistência (Walsh, 2000). A resistência bacteriana é um fenómeno genético relacionado com a existência de genes, presentes no microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antibióticos.

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência natural, ou intrínseca, é um atributo característico de espécies bacterianas em particular. Os mecanismos intrínsecos de resistência podem ser a falta do alvo suscetível ao antibiótico na espécie em questão (o alvo do fármaco não está presente nas vias metabólicas dessas bactérias) ou barreiras naturais características da espécie que impedem o agente antibacteriano de atingir o alvo por razões de impermeabilidade (Chen *et al*, 2011; Varley *et al*, 2009).

A resistência adquirida ocorre quando os genes que conferem resistência às bactérias surgem por mutação ou são incorporados por transferência genética horizontal entre as mesmas espécies e espécies diferentes. A mutação ocorre quando surgem mutantes resistentes a um determinado antibiótico no momento de divisão celular ou por ação de agentes mutagénicos (Tavares, 2009).

A resistência adquirida por transferência de material genético de microrganismos resistentes para os microrganismos suscetíveis é o principal mecanismo pelo qual ocorre a rápida disseminação de genes de resistência através das populações bacterianas (Walsh, 2000). Esta transferência ocorre através de

plasmídeos e elementos de transição (pequenas moléculas de DNA), bacteriófagos, ou conjugação direta entre células bacterianas (Varley *et al*, 2009).

Esta mudança na composição genética de uma bactéria faz com que fármacos que antes eram efetivos contra essas bactérias percam sua atividade, resultando em resistência clínica. Muitas vezes essa mudança genética não resulta na perda completa de atividade do fármaco mas numa diminuição da atividade antibacteriana contra aquela bactéria (Chen *et al*, 2011).

A utilização extensiva de antibióticos na medicina humana e veterinária, nos últimos anos, acelerou a emergência e a propagação de microrganismos resistentes. Segundo um relatório técnico da *European Medicines Agency* (EMA), estima-se que, anualmente, as infeções resistentes aos medicamentos resultem na morte de, pelo menos, 25 mil doentes e custem à União Europeia (UE) 1,5 mil milhões de euros em despesas de saúde e perdas de produtividade (Jornal Oficial da União Europeia, C299, 11 de Dezembro de 2007).

1.3 Antibióticos Veterinários

Com o desenvolvimento agrícola, a produção de animais para consumo sofreu um crescimento exponencial, levando à utilização de produtos químicos orgânicos e inorgânicos, ou seja, aplicação de medicamentos veterinários, para que se atingisse melhores e maiores níveis de produtividade (Boxall *et al*, 2003).

Um antibiótico veterinário pode ser usado em medicina veterinária para tratar e prevenir doenças, mas também como promotor de crescimento e como aditivo alimentar (Sarmah *et al*, 2006; Zuccato *et al*, 2010 e Li, 2014). Atualmente, a utilização de antibióticos como promotores de crescimento está proibida na Europa.

As fluoroquinolonas são consideradas uma importante classe de antibióticos na prática veterinária, juntamente com as tetraciclinas, os macrólidos, as penicilinas, os aminoglicosídeos e combinações como, por exemplo, sulfonamidas e trimetoprim (Schwarz *et al*, 2001). Estes fármacos são utilizados em animais de estimação, em animais de explorações agro-pecuárias e em animais de aquacultura (Ihrke *et al*, 1999).

1.3.1 Legislação geral

A União Europeia, a partir de 1981, começou a introduzir legislação relativa à produção animal que limitava o uso de hormonas naturais para uso terapêutico, na qual proibia o uso de hormonas sintéticas e também proibia a importação de carne de animais aos quais tivessem sido administradas hormonas. Em 1989, já vigorava uma legislação que efetivamente baniu animais e os seus produtos que tivessem sido sujeitos a tratamento com promotores de crescimento.

A utilização de antibióticos como promotores de crescimento foi completamente proibida na Europa em 1996 (Diretiva nº 96/22/CE do Conselho Europeu, 1996).

O Decreto-Lei nº 151/2005 de 30 de Agosto é o diploma legal que apresenta e rege as normas de utilização e presença de antibióticos em carne destinada ao consumo humano, incluindo o fabrico, a venda e administração de antibióticos aos animais. Segundo este decreto-lei, todos os antibióticos administrados aos animais destinados ao consumo humano têm que ser prescritos por um médico veterinário. Este tipo de legislação incita a que os produtores tenham atenção ao intervalo de segurança, ou seja, o tempo que decorre entre a administração do antibiótico e a data de abate do animal. É proibido o abate e a utilização de produtos provenientes de animais sujeitos a tratamento antes do final do intervalo de segurança.

Cabe à Direção Regional de Agricultura (DRA), à Inspeção Geral das Atividades Económicas e à Direção Geral da Agricultura e Veterinária (DGAV) garantir o cumprimento da legislação.

O regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009 estabelece limites máximos de resíduos (LMRs) de antibióticos nos alimentos de origem animal destinados ao consumo humano.

1.3.2 Limites máximos de resíduos

A União Europeia regula estritamente a utilização de medicamentos veterinários. A monitorização de alimentos de origem animal levou à publicação de diferentes regulamentos e diretivas. A utilização de medicamentos veterinários foi

regulada através do Conselho da União Europeia, Regulamento (2377/90/CE), que descreve o procedimento para fixarem os limites máximos de resíduos (LMR) de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. Para cada tecido edível (fígado, rim, gordura, tecido muscular) é determinado um LMR. Segundo a EMEA, o LMR de enrofloxacin e ciprofloxacin (principal metabolito da enrofloxacin) permitido em tecido muscular de aves (frangos e peru) é de 100 µg/kg, para a pele e gordura o LMR também é de 100 µg/kg, sendo para o fígado de 200 µg/kg e para o rim de 300 µg/kg (EMEA, 2002). Porém, como as farinhas de origem animal são desidratadas, a concentração previsível é maior que nos tecidos animais. Não existe um LMR estabelecido para a ciprofloxacin porque o seu uso é proibido em medicina veterinária. Relativamente à norfloxacin, não está estabelecido nenhum LMR porque é um antibiótico de uso em medicina humana (EMEA, 2005).

1.3.3 Mercado e consumo de antibióticos

Já à algumas décadas que os antibióticos são utilizados em grandes quantidades. Em 2002, foi estimado um consumo mundial de cerca de 100000 a 200000 toneladas por ano de antibióticos (Wise, 2002). Em Portugal, a monitorização do consumo de antibióticos está a cargo do INFARMED através do Observatório do Medicamento e Produtos de Saúde. Este participa também no projeto internacional ESAC - *European Surveillance of Antimicrobial Consumption*, coordenado pela Universidade da Antuérpia (Bélgica) e que abrange 34 países, entre os quais os 27 estados membros da EU (Teixeira, 2008).

Em 2007, a EMEA emitiu um relatório com dados relativos a 2003 acerca da quantidade de quinolonas e fluoroquinolonas comercializadas em alguns dos estados membros da União Europeia, no qual se registava que em Portugal tinham sido comercializadas cerca de três toneladas de fluoroquinolonas, como se resume na Tabela 3 (EMEA, 2005).

Tabela 3 Vendas de fluoroquinolonas e quinolonas em alguns países da União Europeia. (*Adaptado de EMEA/CVMP/SAGAM/184651/2005 (2007).*).

País	Venda de antibióticos (em toneladas)	
	Fluoroquinolonas	Quinolonas
Répubblica Checa	0,8	1
Dinamarca	0,1	0,1
Filândia	<0,1	<0,1
França	3,6	20,7
Holanda	0,3	5
Portugal	3	3,8
Suécia	0,2	0,2
Reino Unido	1,4	1,4

Para um país relativamente pequeno como o nosso, em relação a outros países como, por exemplo, a França, verifica-se que existe um consumo elevado de fluoroquinolonas e quinolonas em Portugal. Este fato é preocupante porque estes números elevados acarretam riscos ao nível do desenvolvimento de resistência bacteriana.

1.4 Quinolonas

A introdução de antibióticos na medicina humana e veterinária foi um passo importante na medicina do século XX. Os primeiros antibióticos foram introduzidos nos anos 30 e um elevado número de novos compostos foi descoberto nas décadas seguintes (EMEA, 2007).

A utilização de quinolonas foi iniciada em 1962 quando o ácido nalidíxico (Figura 1) foi descoberto durante a produção de um fármaco contra a malária, sendo descrito por *Leshner e Cols* (Machado *et al*, 2009).

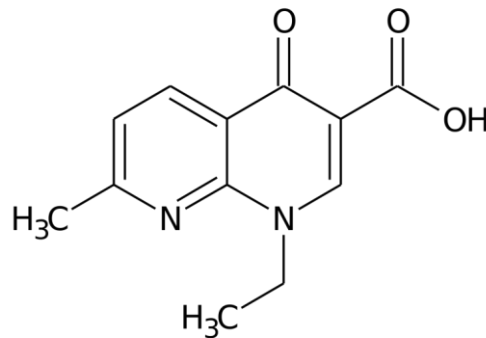


Figura 1 - Estrutura química do ácido nalidíxico. (Adaptado de (Sharma et al, 2009)).

De uma forma geral, as quinolonas podem classificar-se em quatro gerações: a primeira geração compreende as quinolonas originais como o ácido nalidíxico, oxolínico, ácido pipemídico e cinoxacin, entre outras. Estas quinolonas são caracterizadas por uma baixa biodisponibilidade oral, uma distribuição limitada nos tecidos e um limitado espectro de ação, restringindo-se a *Escherichia coli* e alguns organismos Gram-negativos (Ball, 2000; Martinez et al, 2006).

A segunda geração de quinolonas apresenta um aumento da atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As mudanças estruturais existentes nesta segunda geração de quinolonas, em relação à primeira geração, permitem aumentar a sua biodisponibilidade oral e a distribuição sistémica (Ball, 2000; Martinez, 2006).

Em 1980, surgiu a primeira fluoroquinolona (FQ), a norfloxacin (Figura 2), que foi também a primeira FQ a ser utilizada como antibiótico na medicina humana. As fluoroquinolonas (FQs) derivam das quinolonas de 1ª geração como, por exemplo, o ácido nalidíxico, e devem o seu nome à adição de um átomo de flúor na posição 6 e do grupo piperazil na posição 7, melhorando o seu espectro de ação, assim como a sua farmacocinética relativamente a compostos como o ácido nalidíxico. Desta 2ª geração de quinolonas fazem parte FQs como a norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), danofloxacin, difloxacin e marbofloxacin, entre outras.

A norfloxacin possui um largo espectro de ação para a atividade antibacteriana, inclusive para bactérias Gram-positivas, que era uma das limitações das quinolonas mais antigas. Apresenta boa distribuição nos tecidos e boa disponibilidade após administração. É utilizada em tratamentos de doenças respiratórias, biliares e infeções do trato urinário (Ovando et al, 2004).

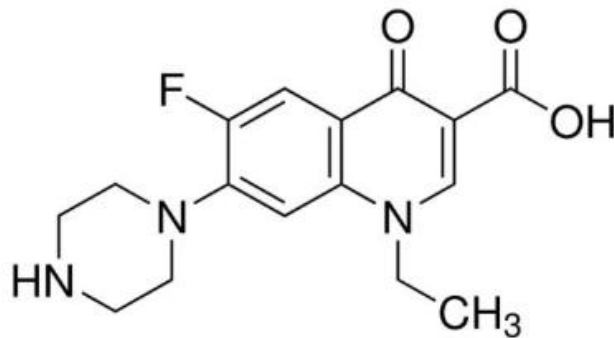


Figura 2 - Estrutura química da norfloxacin. (*Adaptado de (Sharma et al, 2009).*).

A enrofloxacin (Figura 3) foi introduzida no mercado em 1988, sendo das FQs mais utilizadas na medicina veterinária. É uma FQ com grande atividade antibacteriana e bactericida contra bactérias patogénicas encontradas em animais (Salehzadeh *et al*, 2007). Possui várias vantagens por conter um espectro de atividade que abrange a maioria dos Gram-negativos e muitos Gram-positivos. É utilizada na medicina veterinária em cães, gatos, bovinos, suínos e aves (Salehzadeh *et al*, 2007) e possui uma boa capacidade de penetração em fluidos e tecidos.

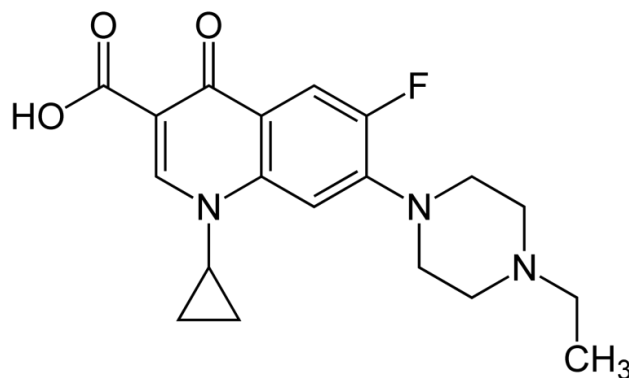


Figura 3 - Estrutura química da enrofloxacin. (*Adaptado de (Sharma et al, 2009).*).

A ciprofloxacin (Figura 4) foi introduzida no mercado em 1987 (Ball, 2000) e é uma FQ amplamente utilizada em medicina humana, sendo a sua utilização em animais proibida. É um dos principais metabolitos da enrofloxacin e possui um amplo espectro de atividade antibacteriana. Tem boa biodisponibilidade após administração e boa distribuição nos tecidos. É considerada o antibiótico da classe das quinolonas mais utilizado em todo o mundo para o tratamento de infeções no Homem.

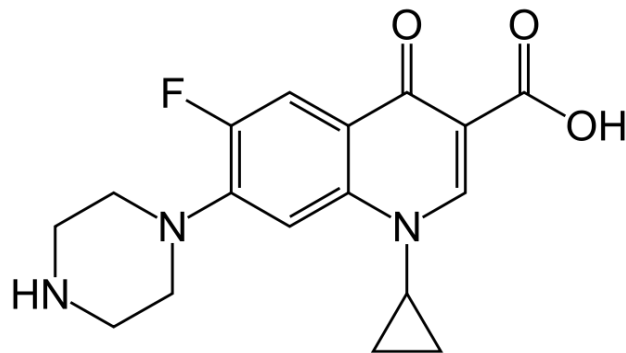


Figura 4 - Estrutura química da ciprofloxacin. (*Adaptado de (Sharma et al, 2009)*).

Na terceira geração de quinolonas mantêm-se as características favoráveis da segunda geração, no entanto, estas evidenciam um aumento da atividade contra bactérias Gram-positivas, bactérias anaeróbias e micobactérias. Estas quinolonas possuem uma excelente biodisponibilidade oral e um tempo de semivida prolongado, além de possuírem menor toxicidade sobre o sistema nervoso central. Neste grupo incluem-se quinolonas como levofloxacin, grepafloxacin e sparfloxacin, entre outras (Ball, 2000).

O grupo da quarta geração de quinolonas mantém o bom espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e amplia a sua ação contra bactérias anaeróbias. Neste grupo encontram-se a trovafloxacin, moxifloxacin e gatifloxacin, entre outras (Sharma *et al*, 2009).

A Tabela 4 ilustra a classificação das quinolonas usadas em medicina humana por gerações, enquanto que a Tabela 5 ilustra a classificação das quinolonas permitidas na UE para uso veterinário.

Tabela 4 - Classificação das quinolonas utilizadas na medicina humana. (*Adaptado de (Sharma et al, 2009)*).

Quinolonas	1ª geração	Ácido nalidíxico	
		Ácido oxolínico	
	Fluoroquinolonas	2ª geração	Ácido pipemídico
			Ácido piromídico
		Cinoxacina	
		Flumequina	
		Roxacina	
		3ª geração	Ciprofloxacin
			Enoxacina
			Enrofloxacin
Fleroxacin			
4ª geração	Lomefloxacin		
	Lomefloxacin		
	Nadifloxacin		
	Norfloxacin		
	Ofloxacin		
	Plefloxacin		
	Rufloxacin		
	Balofloxacin		
Geprafloxacin			
Levofloxacin			
Pazufloxacin			
Sparfloxacin			
Temafloxacin			
Tosufloxacin			
Alatrofloxacin			
Clinafloxacin			
Garenoxacin			
Gatifloxacin			
Gemifloxacin			
Moxifloxacin			
Prulifloxacin			
Sitafloxacin			
Trovafoxacin			

Tabela 5 - Classificação das quinolonas permitidas na UE para uso veterinário. (*Adaptado de (Sharma et al, 2009)*).

Quinolonas	1ª geração		Ácido oxolínico Flumequina
	Fluoroquinolonas	2ª geração	Danofloxacin Difloxacin Enrofloxacin Ofloxacin

1.4.1 Propriedades físico-químicas

É importante mencionar que a atividade antibacteriana das quinolonas depende fortemente do pH do meio em que se encontram, visto que atuam por inibição da DNA girase (enzima alvo destes fármacos) e este é um processo que depende do pH e concentração de ácido. A presença de um grupo ácido (grupo carboxílico) e de um

grupo básico (amina terciária) atribui ao composto propriedades anfotéricas podendo, deste modo, existir mais do que uma espécie presente em solução, dependendo do pH, devido à protonação/desprotonação destes grupos influenciando, assim, o comportamento farmacológico destes compostos, uma vez que a presença de grupos carregados é necessária para a atividade biológica. Dependendo do pH a que se encontra o meio, as quinolonas podem existir sob as formas catiónica, aniónica, neutra ou de ião-dipolar. A pH 7,4 (fisiológico) as quinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas, sendo a espécie predominante a forma de ião dipolar podendo, no entanto, coexistir com as formas aniónica e catiónica (Montero *et al*, 1997; Park *et al*, 2000; Park *et al*, 2002).

Avaliando as constantes de acidez para as diferentes quinolonas verifica-se que, embora as diferenças entre elas sejam pequenas e exista uma similaridade entre elas, essas pequenas diferenças são suficientes para influenciar as espécies que estarão presentes a pH fisiológico. No caso da enrofloxacin, é possível verificar (Tabela 6) que esta, a pH 7,4 se encontra 92% na forma de ião dipolar, 4% na forma aniónica e 4% na forma catiónica. No entanto, a ciprofloxacin, que difere da enrofloxacin apenas pela presença de um átomo de hidrogénio na posição *para* no anel piperazínico, em vez de um grupo etilo, já se encontra 90% na forma de ião dipolar e 10% na forma aniónica (Lizondo *et al*, 1997).

Tabela 6 - Valores de pKa1 e pKa2 associados às constantes de dissociação e propriedades físico-químicas da enrofloxacin e ciprofloxacin. (Adaptado de Park *et al*, 2002; Park *et al*, 2000)).

Quinolona	Massa Molecular	pKa1	pKa2	Espécies presentes a pH fisiológico
Enrofloxacin	359,40	6,12±0,05	7,68±0,42	92% Ião dipolar 4% Aniónica 4% Catiónica
Ciprofloxacin	331,35	6,15±0,15	8,66±0,11	90% Ião dipolar 10% Aniónica

1.4.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação das quinolonas é desencadeado pela inibição de duas enzimas necessárias para a duplicação do DNA: a topoisomerase II e a topoisomerase IV. As duas enzimas têm estruturas semelhantes, possuindo duas sub-unidades

designadas por girase A (Gyr-A) e girase B (Gyr-B), tendo como consequência a inibição destas duas estruturas (Wright *et al*, 2000).

Quando se trata de bactérias Gram-negativas, o principal mecanismo de inibição é o da inibição da topoimerase II, enquanto nas bactérias Gram-positivas é a inibição da topoimerase IV o mecanismo principal (Song *et al*, 1999).

1.4.3 Mecanismo de resistência

A resistência ocorre, principalmente, por alteração na enzima DNA girase, que passa a não sofrer a ação do antibiótico. Pode ocorrer por mutação cromossómica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo ou por alteração da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana (porinas). É possível a existência de um mecanismo que expulse a droga do interior da célula (bomba de efluxo) (Dalhoff, 2012).

Devido ao uso excessivo das quinolonas, o aparecimento de resistências bacterianas fez com que fosse necessário apresentar novas estruturas que possuíssem um espectro de ação maior e que atuassem nas estirpes resistentes. Estas alterações estruturais, provavelmente, influenciam as propriedades físico-químicas dos antibióticos que, por sua vez, estarão relacionadas com a maior atividade antibacteriana que as gerações mais recentes apresentam (Dalhoff, 2012).

Existe, actualmente, um número elevado de novas fluoroquinolonas e as modificações estruturais efetuadas permitiram que esta classe de antibióticos se desenvolvesse drasticamente, desde os primeiros compostos sintetizados (com aplicação limitada) até aos novos compostos, cujo maior espectro de ação e farmacocinética permitem uma única dosagem diária (Dalhoff, 2012).

1.5 Metodologias analíticas para extração, deteção e quantificação de antibióticos veterinários

Numa perspetiva de segurança, devido ao risco para o Homem, a monitorização de resíduos de FQs em alimentos deve constituir um programa de

vigilância constante com metodologias analíticas adequadas, de acordo com a regulamentação da UE.

Um programa de controlo de resíduos de antibióticos engloba métodos de *screening*, quantificação e de confirmação.

Uma vez que a concentração dos resíduos de antibióticos em matrizes biológicas é muito baixa, são necessários métodos de deteção sensíveis.

O cumprimento destes programas de monitorização implica o *screening* deste tipo de compostos, exigindo metodologias analíticas simples, rápidas, pouco onerosas e sensíveis, que não dêem origem a resultados falso negativos, embora sejam aceitáveis alguns resultados falso positivos, uma vez que são submetidos, posteriormente, a métodos de confirmação (Bruno *et al*, 2009).

1.5.1 Extração e purificação

A principal finalidade desta fase consiste na obtenção de um produto definitivo que seja representativo da globalidade do alimento do qual a amostra é tomada, de forma a ser adequada à extração sem perdas de resíduos ou alterações na sua estrutura química (Speltini *et al*, 2011).

As técnicas de extração e purificação, para além de minimizarem o tempo e o material usado na análise, devem proporcionar a obtenção de extratos limpos, com o mínimo de interferências, e que possuam elevadas concentrações dos resíduos em estudo (Speltini *et al*, 2011).

As técnicas de extração e purificação aplicadas à análise de resíduos de FQs nos alimentos incluem aquecimento com ácidos, extração/desproteínização com ácidos ou solventes orgânicos miscíveis com água, combinados com tampões ou ácidos, extração com tampões, extração assistida por micro-ondas, ultracentrifugação, partição líquido-líquido, dispersão da matriz em fase sólida e extração em fase sólida (Speltini *et al*, 2011).

1.5.1.1 Extração assistida por micro-ondas

Em 1946, *Percy Spencer* descobriu a função do micro-ondas como uma fonte de aquecimento. Em 1975, foi aplicado o uso do micro-ondas às digestões ácidas nas determinações de metais (*Abu-Samra et al*, 1975). A partir deste trabalho, muitos outros foram desenvolvidos e, posteriormente, foi aprovado pelas agências reguladoras como sendo o método de referência para extração de compostos. Em 1992, patenteou-se um processo designado como extração assistida por micro-ondas (MAE) para a extração de óleos a partir de matrizes biológicas. No ano 2000, MAE foi aprovado pela *Environmental Protection Agency* (EPA) como um método de referência para a extração de compostos semivoláteis e não voláteis em amostras sólidas. Nos últimos tempos, numerosos compostos têm sido extraídos de vários tipos de matrizes (*Sun e Lee*, 2002).

Uma das principais vantagens do recurso a MAE é a redução do tempo de extração, devido à diferença entre o tipo de aquecimento aplicado no aquecimento convencional e na utilização de energia de micro-ondas. Adicionalmente, a MAE permite uma redução significativa no consumo de solventes e a possibilidade de múltiplas extrações numa só corrida (*Costa*, 2004). A eficiência da MAE é influenciada pela escolha de diversos parâmetros de extração, nomeadamente, o solvente, a temperatura e o tempo de extração (*Winefordner*, 2003).

1.5.1.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE) é vulgarmente usada para limpezas da matriz e pré-concentração dos analitos. Na extração em fase sólida, os analitos contidos numa matriz líquida são extraídos conjuntamente com os compostos interferentes (se existirem), após passarem por um cartucho contendo uma fase sólida (adsorvente). Esta pode ser constituída por partículas porosas de pequenas dimensões, nas quais a sílica se encontra ligada a uma fase orgânica ou a um polímero orgânico, embora também existam outro tipo de adsorventes (*Supelco*, 1998). Esta tecnologia apresenta

vantagens em relação aos métodos de extração clássicos: é uma técnica mais rápida e, geralmente, mais eficiente (em termos de percentagem de recuperação), envolve um menor manuseamento, reduzindo as probabilidades de perdas e/ou contaminações, permitindo uma maior reprodutibilidade nos resultados e a quantidade de solventes utilizada é relativamente baixa. Tal como mencionado anteriormente, em SPE os solutos são extraídos da fase líquida para uma fase sólida. Existem diferentes tipos de SPE, tendo em conta as interações estabelecidas entre a matriz líquida e o adsorvente: SPE em fase reversa (extração de analitos orgânicos polares ou hidrofóbicos de matrizes aquosas), SPE em fase normal (extração de analitos polares de solventes orgânicos não-polares) e SPE por permuta iónica (extração de analitos carregados de amostras aquosas ou de solventes orgânicos não-polares). As principais etapas do processo de extração de SPE são as referidas seguidamente (Poole *et al*, 2000).

- (i) Condicionamento - antes de se iniciar a retenção dos analitos pela fase estacionária, o cartucho deve ser preparado de modo a tornar-se compatível com a solução;
- (ii) Retenção - a amostra líquida a extrair atravessa a coluna de SPE através da aplicação de pressão ou da utilização de uma bomba. O fluxo deve ser constante e ter em conta as dimensões da coluna e das partículas que constituem o adsorvente;
- (iii) Lavagem - esta é efetuada de modo a remover interferentes que se encontrem co-adsorvidos na matriz sólida das colunas de SPE. A remoção de iões inorgânicos do adsorvente sólido pode ser realizada com água, embora a remoção de outros interferentes que se encontrem fracamente adsorvidos tenha de ser realizada com água com 5 - 20% de solvente orgânico adequado. Esta etapa pode ser eliminada ou substituída por uma fase de secagem com vácuo ou com um baixo fluxo de um gás;
- (iv) Eluição - nesta fase os analitos adsorvidos são removidos da fase sólida e retornam à fase líquida, recorrendo a solventes orgânicos como eluentes. Estes devem eluir completamente os analitos presentes na fase sólida, utilizando o menor volume possível. O solvente de eluição deve ser adicionado lenta e cuidadosamente ao adsorvente e deve ser compatível com os métodos analíticos que se vão utilizar posteriormente.

1.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Na literatura científica encontram-se descritas várias metodologias analíticas para a determinação de antibióticos em alimentos de origem animal. O método cromatográfico mais utilizado para deteção e quantificação de antibióticos veterinários em matrizes de origem animal é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Stolker e Brinkman, 2005).

Na cromatografia líquida de fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é ligeiramente polar e, atualmente, este é o método mais utilizado na deteção de antibióticos veterinários. A fase reversa baseia-se no princípio de interações hidrofóbicas que resultam em forças repulsivas entre um eluente polar, uma molécula pouco polar e a fase estacionária apolar. A parte da molécula não polar fica ligada à fase estacionária. Quanto mais apolar for o solvente, mais forças se vão criar com a molécula pouco polar e menor será o seu tempo de retenção. Outro fator importante é o pH. Este pode alterar a polaridade da molécula a analisar e alterar as suas interações com a fase móvel e a estacionária. As interações químicas e físicas entre a fase móvel e a fase estacionária determinam o tempo de retenção na coluna até à sua eluição. A fase móvel pode ter uma composição constante (isocrática) ou pode-se alterar durante a eluição (gradiente). O recurso a gradiente pode ser importante caso não seja possível a separação de dois ou mais compostos com apenas um tipo de fase móvel e um tipo de fase estacionária. Também melhora a resolução para compostos que demoram muito tempo a eluir, que eluiriam lentamente, e não num período curto que permitisse a sua identificação e quantificação (Speltini *et al*, 2011).

1.5.3 Cromatografia líquida por interação hidrofílica

A cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC) pode ser considerada uma forma de HPLC que utiliza uma separação do tipo fase normal, especialmente a fase estacionária hidrofílica, porém com elementos de fase reversa – em especial a fase móvel. Assim sendo, utiliza uma coluna com fase estacionária hidrofílica e uma mistura de solventes com elevada concentração de solvente orgânico miscível com água. A ordem de eluição num sistema HILIC será praticamente a contrária de um que

opera em modo reverso. A retenção é proporcional à polaridade do soluto e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel (Alpert, 1990).

A típica fase móvel empregue para separação de compostos não ionizáveis em HILIC consiste numa solução contendo acetonitrilo (ACN) e uma pequena proporção de água. Nesses casos, como na separação de carboidratos, não é necessário o uso de tampões. Para compostos ionizáveis, a escolha de um tampão adequado é difícil devido à baixa solubilidade dos tampões tradicionalmente usados em fase reversa, tais como o fosfato em fases móveis, contendo altas proporções de solventes orgânicos (Alpert, 1990).

Na cromatografia líquida por interação hidrofílica, uma quantidade adequada de água (entre 5-15%) na fase móvel permite formar uma boa camada de água na superfície da fase estacionária polar, contribuindo para a partição dos analitos. A HILIC separa os compostos eluindo uma fase móvel orgânica forte contra uma fase estacionária hidrofílica, sendo esta eluição conduzida pelo aumento da água na fase móvel.

Considerando que a estabilidade das colunas baseadas em sílica (ainda as mais utilizadas em HILIC) é comprometida pelo aumento do pH, é comum utilizar-se, nesse modo, aditivos ácidos, principalmente o ácido fórmico e o ácido acético.

Em soluções que contêm um elevado teor de solvente orgânico, o pH dessas soluções ácidas aumenta em função da supressão da ionização, podendo causar distorção na forma dos analitos ionizados. Aditivos iónicos, tais como o formato e o acetato de amónio, são bastante utilizados para controlar o pH da fase móvel e a força iónica do meio e resolver o problema da baixa ionização dos ácidos em meio orgânico. Estes tampões são suficientemente voláteis para serem compatíveis com o seu uso na técnica de LC/MS.

Uma vez que muitos fármacos veterinários são compostos de elevada polaridade, a HILIC tem sido empregue em diversas análises, especialmente quando os antibióticos estão presentes em baixas concentrações.

1.5.4 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) em que são aplicados espectrómetros de massa como detetores, tem sido cada vez mais utilizada em separações por cromatografia líquida. Nos últimos anos, tem-se assistido a uma mudança da utilização de *ion-traps*, espectrómetros de massa simples e triplo quadrupolo, com o objetivo de, por espectrometria de massa, obter massas mais precisas dos analitos em estudo. Constitui um exemplo, a utilização de espectrómetros de massa equipados com detetores *Orbitrap*.

O mais moderno espectrómetro de massa, *Orbitrap*, descrito por Makarov (2000), ganhou vantagem em relação a outro tipo de espectrómetros, tornando-se o mais utilizado. Permite obter múltiplos níveis de fragmentação (MS^n) o que é muito importante para elucidar qual a estrutura do analito, permitindo ainda o acoplamento com fontes de ionização contínuas tais como fonte de ionização química à pressão atmosférica, por *electrospray* (ESI) ou *nanoelectrospray* (Makarov e Scigelova, 2010).

O desempenho analítico do analisador *Orbitrap* suporta uma ampla gama de aplicações na identificação de compostos em diversas vertentes, como em misturas complexas, na identificação de proteínas, metabolismo de drogas, controlo de *doping* ou até mesmo na deteção de contaminantes alimentares. O espectrómetro de massa híbrido *LTQ-Orbitrap* (Figura 5) é constituído por duas partes funcionais principais: o *linear trap quadrupole* (LTQ) ou *linear ion trap* e o *Orbitrap*. O LTQ é responsável pela captura dos iões, pela seleção dos iões, pelas reações de fragmentação e pela deteção de iões com baixa resolução, enquanto que o *Orbitrap* realiza a deteção de iões com alta acuidade de massas e resolução. O analisador de massas *Orbitrap* é formado por dois elétrodos externos e um central (Figura 6). Os iões injetados no *Orbitrap* são capturados num campo eletrostático e a atração eletrostática em direção ao elétrodo central é compensada por uma força que resulta da velocidade tangencial dos iões. O campo eletrostático força os iões a moverem-se em padrões espirais complexos. A componente axial dessas oscilações é independente de energia inicial, ângulos e posições, e pode ser detetada como uma imagem nos elétrodos externos. A transformação de *Fourier* é utilizada para se obter as frequências de oscilação para iões com diferentes massas, resultando numa leitura precisa da razão massa/carga

m/z deles. As frequências são finalmente convertidas em espectros de massa (Makarov e Scigelova, 2010).

A espectrometria de massa de alta resolução acoplada a LC é uma combinação muito poderosa na análise química.

Em contraste com a técnica convencional de cromatografia líquida (HPLC com outros detetores) e devido às técnicas convencionais de ionização utilizadas para detecção através de espectrometria de massa, apenas solventes voláteis e tampões podem ser utilizados para LC acoplada a MS. Assim, podem ser usados acetoneitrilo, metanol, água, 2-propanol, ácido acético, acetato de amónio e formato de amónio ($2-10 \text{ mM L}^{-1}$).

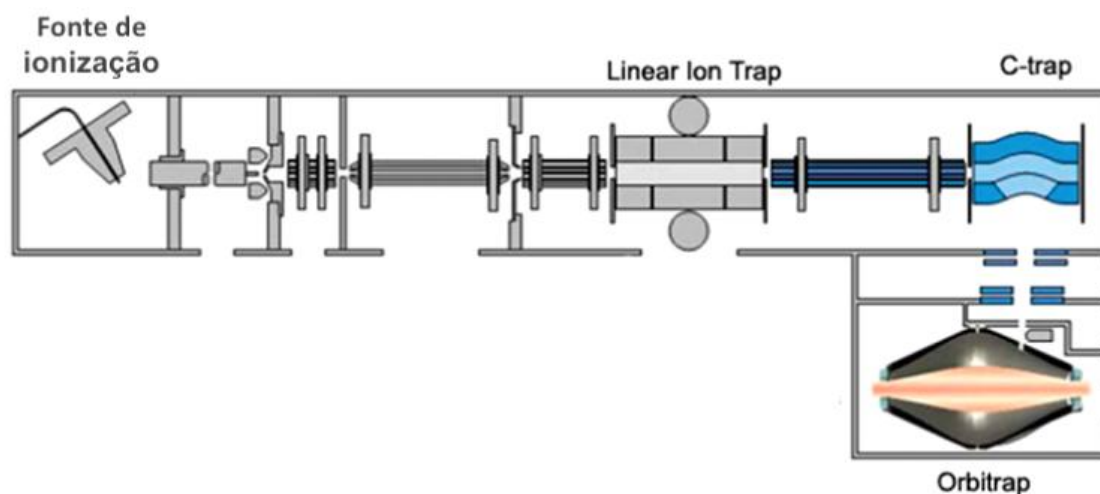


Figura 5 - Esquema de um espectrómetro de massa híbrido, LTQ-Orbitrap. (Disponível em <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#.V8mKRORUSpo>).

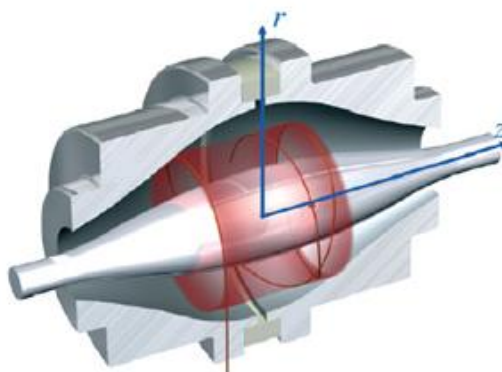


Figura 6 - Estrutura interna do analisador de massa Orbitrap. (Disponível em <http://americanlaboratory.com/914-Application-Notes/18815-Breakthrough-Technology-for-Bottom-Up-Proteomics-and-Small-Molecule-Research/>).

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo otimizar um método de extração assistida por micro-ondas (MAE), seguida cromatografia líquida de fase reversa acoplada a um detetor de díodos (RPLC-DAD), ou de cromatografia líquida de interação hidrofílica, acoplada a um detetor de díodos (HILIC-DAD) ou a um espectrómetro de massa em tandem (HILIC-MS/MS), para a determinação dos antibióticos da família das fluoroquinolonas enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin, em farinha de aves e penas. Estas farinhas são produzidas através do tratamento de subprodutos de categoria 3, nomeadamente penas, vísceras e ossos resultantes da desmancha de animais para consumo humano. Durante a produção avícola, pode ter sido administrada a estes animais enrofloxacin para tratamento de eventuais infeções.

3. Materiais e métodos

3.1 Materias e Reagentes

Na realização deste trabalho foram utilizados acetonitrilo (LC-MS Grade) adquirido à Fisher Scientific (UK); ácido fórmico (98% de pureza) adquirido à Sigma-Aldrich (USA); metanol (CHROMASOLV® para HPLC, 99,9% de pureza) adquirido à Sigma-Aldrich (USA); ácido acético glacial (Pronalab) e acetato de amónio (Sigma-Aldrich). Os antibióticos norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin e roxitromicina foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Barcelona, Espanha). Utilizou-se azoto comprimido da Air Liquide (Madrid, Espanha).

Para garantir que não havia contaminação, todos os materiais utilizados foram lavados com água e sabão, lavados com água desionizada e depois colocados num banho de ácido nítrico a 20% (v/v) durante a noite e novamente lavados com água desionizada e secos numa estufa a cerca de 40 °C.

3.2 Padrões de antibióticos

Foram preparadas soluções padrão individuais de cada um dos antibióticos utilizados, norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin, por dissolução de cada composto em metanol, com uma concentração de 1 g L^{-1} . A partir dessas soluções padrão foram preparadas soluções padrão de trabalho de enrofloxacin com concentração de 1 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} , em metanol. Soluções padrão de trabalho de concentração de 10 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} , foram igualmente preparadas com a mistura dos três antibióticos norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin. Foram também preparadas soluções padrão de trabalho de roxitromicina com concentração de 1 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} em metanol. Todas as soluções padrão foram armazenadas em frascos de vidro escuro a -18°C .

3.3 Amostras

As amostras de farinhas de penas foram cedidas pela empresa Avicasal S.A. e as amostras de farinhas de aves foram cedidas pela empresa Savinor, S.A. e têm as características indicadas na tabela 7.

Tabela 7 - Características de farinhas obtidas a partir de aves e penas.

Tipo de farinha	% de proteína	% de gordura	% de cinzas	% de humidade
Aves	68,2	13,3	13,2	4,5
Penas	82,5	10,4	3,8	4,6

3.4 Extração assistida por micro-ondas

Amostras de 2 g de farinha de aves e de farinha de penas, em 10 mL de metanol/ácido fórmico ($95:5 \text{ v/v}$), foram sujeitas a um processo de digestão por micro-

ondas num equipamento ETHOS 1, da Milestone Inc. (Shelton, CT, EUA), durante 15 minutos à temperatura de 30 °C.

Amostras de cada farinha dopadas com 10 µg de enrofloxacin ou 10 µg de norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin (200 µL de solução padrão de trabalho de concentração de 50 mg L⁻¹) foram digeridas como descrito anteriormente.

Após digestão, todas as amostras foram sujeitas a um processo de centrifugação a 2000 rotações por minuto (RPM) em centrífuga SELECTA® MIXTASEL (Barcelona, Espanha) durante 5 minutos, sendo recuperados, no final, 1 mL de sobrenadante. Este foi armazenado em frasco de vidro escuro para posterior processamento por técnica de SPE.

3.5 Extração em Fase Sólida

Foi realizada SPE em cartuchos Oasis HLB (60 mg, 3 mL) da Waters Corporation (Milford, MA, EUA), adaptados a um sistema de vácuo SUPELCO, VISIPREP™ (Espanha) que se encontrava conectado a uma bomba de vácuo.

Para as amostras analisadas por cromatografia líquida de fase reversa os cartuchos foram sujeitos a um pré-condicionamento com 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de água desionizada. De seguida, passaram pelos cartuchos 20 mL de amostra, obtida por adição de 1 mL do sobrenadante, extraído do vaso do microondas, a 19 mL de água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v). Seguiu-se uma etapa de lavagem dos cartuchos com 5 mL de metanol/água desionizada (5:95 v/v) com posterior secagem durante 30 minutos em condições de vácuo. Por fim, realizou-se a eluição com 5 mL de metanol/ácido fórmico (95:5 v/v). As amostras foram secas sob um fluxo de azoto, a 35 °C, e posteriormente ressuspensas em 2 mL de água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v) antes da injeção.

Para as amostras analisadas por cromatografia por interação hidrofílica, os cartuchos foram sujeitos a um pré-condicionamento com 1 mL de metanol, seguidos de 1 mL de água desionizada. De seguida, passaram pelos cartuchos 20 mL de amostra, obtida por adição de 1 mL do sobrenadante, extraído do vaso do microondas, a 19 mL de água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v). Seguiu-se uma etapa de lavagem dos cartuchos com 1 mL de metanol/água desionizada (5:95 v/v) e, por fim, realizou-se a eluição com 1 mL de metanol.

3.6 Cromatografia líquida de fase reversa acoplada a um detetor de díodos

A determinação cromatográfica pela técnica de RPLC foi realizada recorrendo aos equipamentos Beckman Coulter System Gold® 508 Solvent Module com um detetor de arranjo de díodos (Beckman Coulter System Gold® 168 Detector) e um amostrador automático (Beckman Coulter System Gold® 508 Autosample) (Brea, CA, EUA). A separação de analitos foi feita recorrendo a uma coluna Kinetex® 2,6 µm C18 100 Å, 100 mm × 4,6 mm da Phenomenex (Torrance, CA, EUA).

O programa cromatográfico foi adaptado de um método previamente desenvolvido (Caveneti *et al*, 2012). A corrida cromatográfica iniciava-se com a utilização de 100% de eluente A (água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v)) mantendo-se as condições isocráticas durante 2 minutos, seguindo-se um gradiente decrescente até atingir 70% de eluente A e 30% de eluente B (acetonitrilo) durante 9 minutos. As condições iniciais (100% de eluente A) eram retomadas com um gradiente crescente durante 7 minutos, completando assim 18 minutos de corrida cromatográfica. No final era feita uma reequilibração de tempo de 2 minutos para restaurar a coluna.

O fluxo adotado foi de 1,0 mL min⁻¹ durante os 2 minutos iniciais, seguido de um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ até aos 11 minutos, voltando ao fluxo de 1,0 mL min⁻¹ nos 7 minutos finais.

O volume de injeção foi fixado nos 50 µL num tempo de corrida cromatográfica de 18 minutos, sendo o detetor de sinal monitorizado ao comprimento de onda λ= 280 nm.

Os eluentes utilizados foram filtrados através de filtros com porosidade 0,45 µm (Whatman®) e degaseificados num banho de ultrassons durante 15 minutos.

A partir da solução padrão de trabalho com mistura de antibióticos foram preparadas soluções com uma gama de concentração – 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ em 75% água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v) e 25% de metanol, e injetadas.

As amostras de farinha não dopadas antes da extração por micro-ondas, que no final do processo de SPE tinham sido ressuspendidas em água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v) foram injetadas nessa forma, ou injetadas dopadas com solução de trabalho de antibióticos, na mesma gama de concentração referida anteriormente.

As amostras de farinha dopadas antes da extração por micro-ondas, que no final do processo de SPE tinham sido ressuspensas em água desionizada/ácido fórmico (99:1 v/v), foram injetadas nessa forma.

3.7 Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a um detetor de díodos

Usou-se o mesmo equipamento descrito no ponto anterior, recorrendo a uma coluna LUNA HILIC 5 μm , 150 x 4.6 mm da Phenomenex, com uma pré-coluna SecurityGuard™ HILIC 4 x 3 mm também da Phenomenex. O programa cromatográfico foi adaptado de métodos previamente desenvolvidos (Locatelli *et al*, 2013; Gentili *et al*, 2005; Kahsay *et al*, 2014) assim como dos guias de utilização que acompanhavam a coluna HILIC.

Foram testadas duas fases móveis A, nomeadamente acetato de amónio 5 mM L⁻¹ a pH 4,3 ou pH 3,5 (o ajuste de pH foi feito utilizando ácido acético) e foi possível observar que a fase móvel com melhor resolução dos picos (e tempo de retenção menor) era a de pH 3,5, sendo esta a adotada. A fase móvel B era constituída por acetonitrilo.

Foi realizada uma eluição isocrática utilizando 70% de fase móvel B e 30% de fase móvel A durante 10 minutos de corrida. O fluxo foi estabelecido a 1 mL min⁻¹. Os eluentes utilizados foram filtrados através de filtros com porosidade 0,45 μm (Whatman®) e degaseificados num banho de ultrassons durante 15 minutos.

Da solução padrão de trabalho de 10 mg L⁻¹ de enrofloxacin foram preparadas soluções com uma gama de concentração 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹ em metanol, e injetadas.

As amostras de farinha não dopadas antes da extração por micro-ondas, que no final do processo de SPE tinham sido eluídas em metanol, foram injetadas nessa forma, ou injetadas dopadas com solução de trabalho de enrofloxacin na mesma gama de concentração referida anteriormente.

3.8 Optimização do método de extração e das condições cromatográficas recorrendo a cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massa

As análises foram realizadas no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) usando um espectrómetro de massa híbrido LQT Orbitrap™ XL da Thermo Fischer Scientific, controlado por LQT Tune Plus 2.5.5, utilizando uma coluna LUNA HILIC 5 μm , 150 x 4.6 mm da Phenomenex, com uma pré-coluna SecurityGuard™ HILIC 4 x 3 mm também da Phenomenex.

A fase móvel A utilizada consistiu numa solução tampão de acetato de amónio 5 mM L⁻¹, a pH 3,5 (ajuste de pH com ácido acético) e a fase móvel B consistiu em acetonitrilo. Foi realizada uma eluição isocrática utilizando 70% de fase móvel B durante 5 minutos. Aos 6 minutos, a fase móvel B foi aumentada para os 100%, durante 1 minuto, e mantida durante 2 minutos. Aos 9 minutos a fase móvel B retomou aos 70% durante 1 minuto, e o sistema foi depois equilibrado para as condições iniciais durante 1 minuto. O fluxo foi estabelecido em 1 mL min⁻¹. Aquando da chegada ao detetor de massas o fluxo desceu para 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 10 μL e a temperatura do carrossel que continha os *vials* foi mantida nos 40 °C.

A voltagem do capilar da fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) foi operada no modo positivo com 3,1 kV. O azoto foi utilizado como gás de arrasto, a um fluxo de 40, e também utilizado como gás auxiliar a um fluxo de 10 (as unidades foram providenciadas pelas definições do *software*). A temperatura do capilar foi mantida a 275 °C. A voltagem do capilar foi 49 V e a voltagem na lente do tubo foi de 110 V.

A enrofloxacin (360,17 *m/z*) e a roxitromicina (*m/z* 837,53) foram monitorizadas em modo *selected ion monitoring* (SIM). Para a enrofloxacin, a uma energia de colisão de 35 V, foi feito um *multiple reaction monitoring* (MRM) e foram selecionados os iões de maiores intensidades relativas (expressas como percentagem da intensidade da transição ou do ião mais intenso) 360,17 > 316,18 e 360,17 > 342,16. O software Xcalibur Qual Browser® 2.1.0 foi utilizado para analisar os dados.

Das soluções padrão de trabalho de enrofloxacin com concentração de 1 mg L⁻¹, foram preparadas soluções com uma gama de concentração – 5; 10; 50; 100 e 500

$\mu\text{g L}^{-1}$ por diluição em mistura de 70% de metanol e 30% de acetato de amónio 5 mM L^{-1} a pH 3,5.

A roxitromicina da solução padrão de trabalho de 1 mg L^{-1} foi utilizada como padrão interno, tendo sido adicionada a todas as amostras.

As amostras de farinha não dopadas antes da extração por micro-ondas, que no final do processo de SPE tinham sido eluídas em metanol, foram preparadas como acima referido (70% de metanol e 30 % de acetato de amónio 5 mM a pH 3,5) e injetadas nessa forma, ou injetadas dopadas com solução de trabalho de enrofloxacin, na gama de concentração 50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As amostras de farinha dopadas antes da extração por micro-ondas, que no final do processo de SPE tinham sido eluídas em metanol, foram preparadas também com 70% de metanol e 30 % de acetato de amónio a 5 mM, pH 3,5, de forma a obter concentrações finais na mesma gama (50 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) e foram injetadas nessa forma.

3.9 Análise estatística

Após a recolha de dados referentes aos tempos de retenção dos analitos assim como às áreas registadas nos cromatogramas, foram calculadas as médias tendo sido aplicados testes de *t-student* e ANOVA (Análise de Variância) com um grau de confiança a 95%, no *software* Microsoft Excel 2010 desenvolvido pela Microsoft Corporation (Redmond, WA, EUA) e no SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*).

As taxas de recuperação dos antibióticos em estudo foram calculadas através dos parâmetros das retas de calibração nas matrizes de farinha de aves e penas.

O limite de deteção (LOD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detetada, embora não seja necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração de substância em análise que pode ser quantificada. $\text{LOD} = 3 \times s/S$ e $\text{LOQ} = 10 \times s/S$, no qual *s* é o desvio padrão e *S* é o declive da reta de calibração.

4. Resultados e discussão

4.1 Cromatografia líquida de fase reversa com detetor DAD

Com recurso à injeção de soluções padrão, numa gama de concentração 0,1-1,0 mg L⁻¹, foi possível concluir que se observa uma resposta linear para os três antibióticos (Tabela 8). A linearidade evidencia a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos cromatogramas e as concentrações dos analitos presentes nas amostras, relação tanto maior, quanto mais próximo for o valor do coeficiente de correlação r^2 da unidade (EMEA 2012).

Tabela 8 – Parâmetros das retas de regressão linear e limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ).

Antibiótico	Declive	Ordenada na origem	Coeficiente de correlação (R^2)	LOD mg L ⁻¹	LOQ mg L ⁻¹
Norfloxacin	340719	-2853	0,9997	0,03	0,1
Ciprofloxacin	393674	-3219	0,9997	0,03	0,1
Enrofloxacin	424372	-4527	0,9995	0,04	0,1

Também foi possível concluir que as condições em que foram obtidos os resultados eram adequadas para a obtenção de cromatogramas com resolução suficiente para a quantificação dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin, embora os picos da norfloxacin e ciprofloxacin não se encontrassem totalmente resolvidos. O tempo de retenção dos antibióticos norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin foi 10,4 minutos, 10,6 minutos e 11,2 minutos, respetivamente.

As amostras de farinha foram analisadas de acordo com a metodologia referida anteriormente, com o intuito de saber se os cromatogramas das farinhas apresentavam, com o mesmo tempo de retenção dos compostos em estudo, sinais que comprometessem a seletividade do método (devidos a impurezas, produtos de degradação, bem como outros componentes eventualmente presentes na matriz).

Na Figura 7 apresenta-se no painel A um cromatograma típico de um extrato de farinha de aves não dopada digerida no micro-ondas, e no painel B, a mesma amostra após a adição de padrão antes da injeção no cromatógrafo. Ao analisar o cromatograma do painel B, verifica-se que os picos da norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin são distinguíveis da linha de base da matriz.

A Figura 8 apresenta no painel A um cromatograma típico de um extrato de farinha de penas não dopada digerida no micro-ondas, e no painel B, a mesma amostra após a adição de padrão antes da injeção no cromatógrafo. Também neste caso se observa que os picos da norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin são distinguíveis da linha de base da matriz.

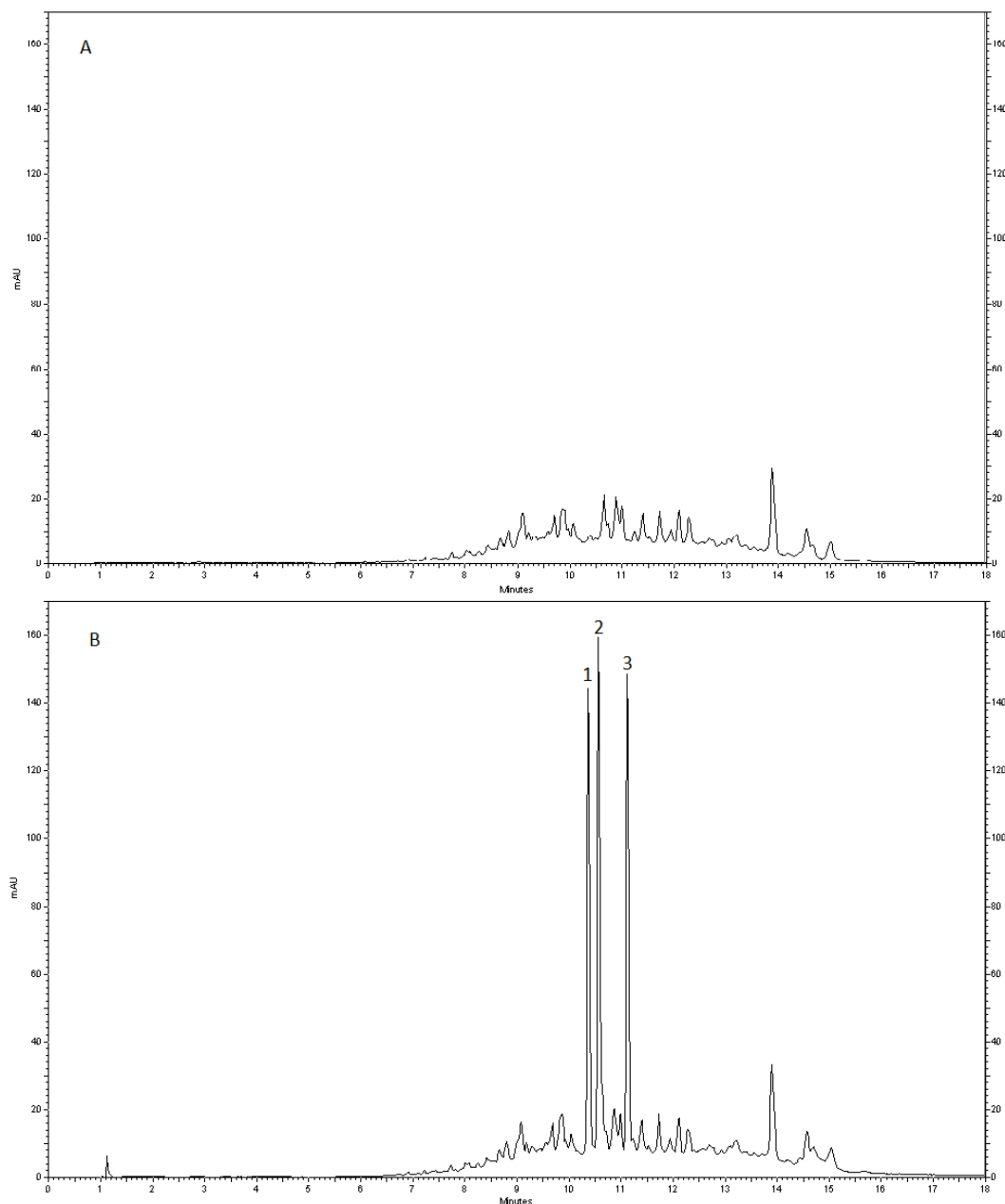


Figura 7 - A: Cromatograma de um extrato de farinha de aves não dopada. B: Cromatograma da mesma amostra após adição de padrão antes da injeção no cromatógrafo. Norfloxacin (1), Ciprofloxacin (2) e Enrofloxacin (3). Tempos de retenção: (1) 10,4 minutos; (2): 10,6 minutos; (3): 11,1 minutos. Concentração de norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin igual a 1 mg L^{-1} .

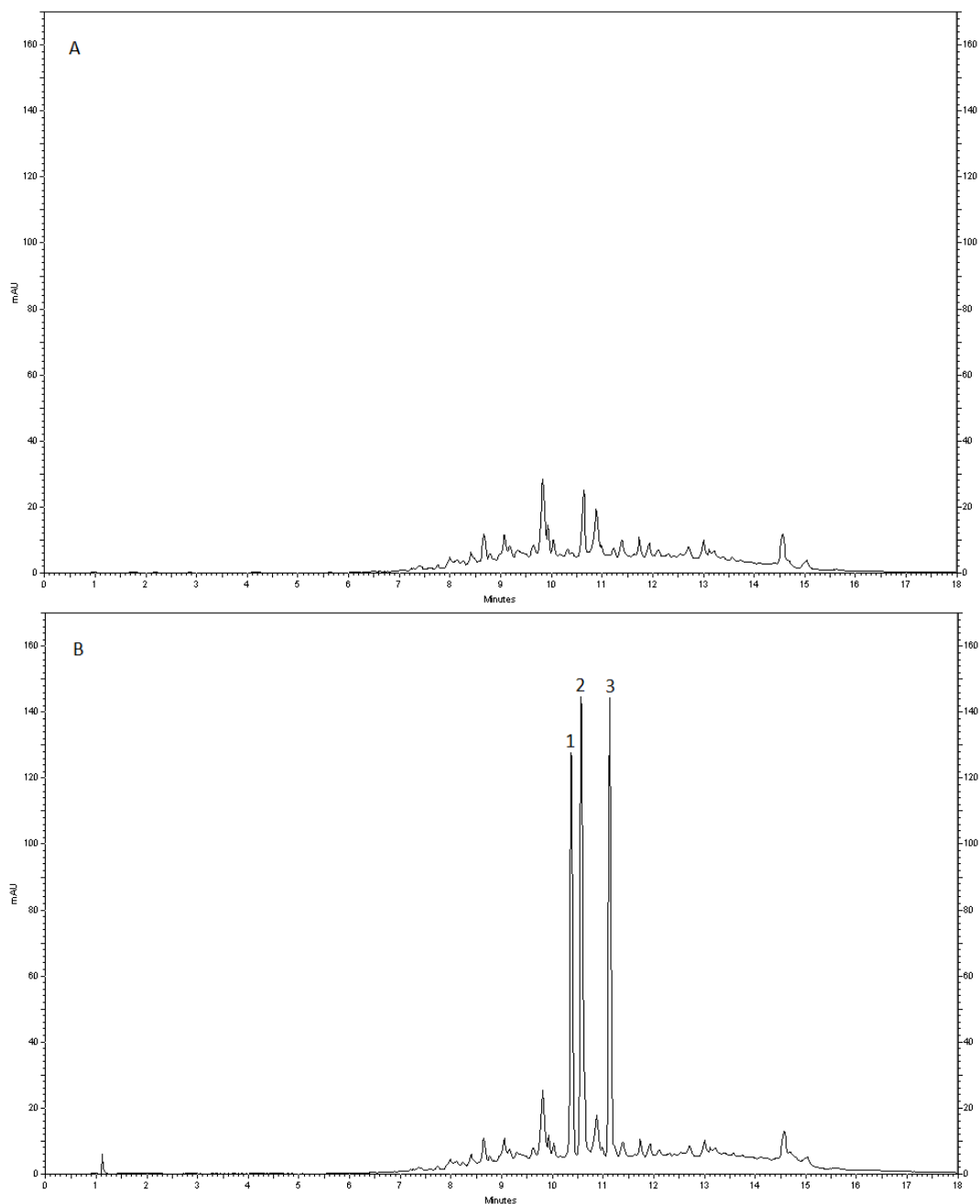


Figura 8 - A: Cromatograma de um extrato de farinha de penas não dopado. B: Cromatograma da mesma amostra após adição de padrão antes da injeção no cromatógrafo. Norfloxacin (1), Ciprofloxacin (2) e Enrofloxacin (3). Tempos de retenção: (1) 10,4 minutos; (2): 10,6 minutos; (3): 11,1 minutos. Concentração de norfloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin igual a 1 mg L⁻¹.

Para a construção das retas de calibração na matriz de farinha foram utilizadas amostras de farinha digeridas no micro-ondas e, posteriormente, dopadas com antibióticos na gama de concentração utilizada previamente ($0,1$ a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$). Foram realizados testes *t-student* a um grau de confiança de 95% para comparar os declives da reta de calibração com padrões e da reta de calibração na matriz de farinha, concluindo-se que eram estatisticamente diferentes. Verificou-se, assim, que o efeito de matriz não permite que estes antibióticos sejam quantificados recorrendo à reta de calibração com padrões em metanol.

No caso das matrizes de farinha de aves e de penas observou-se linearidade na gama de concentrações analisada (Figuras 9 a 14).

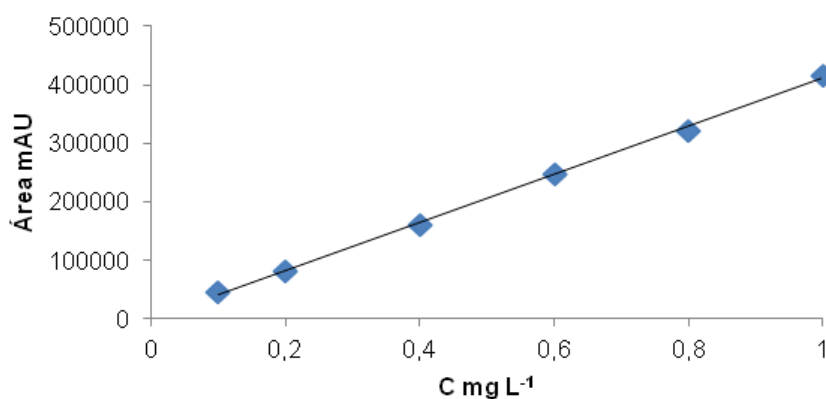


Figura 9 - Reta de calibração da norfloxacin em farinha de aves em função da concentração (mg L^{-1}) ($0,1$; $0,2$; $0,4$; $0,6$; $0,8$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). ($n=1$).

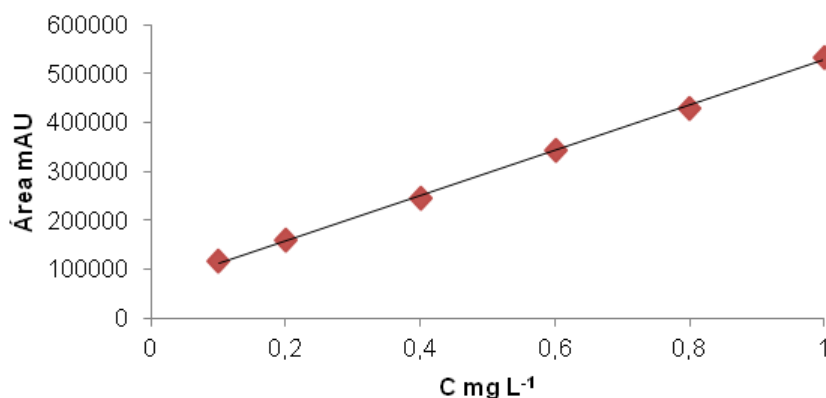


Figura 10 - Reta de calibração da ciprofloxacin em farinha de aves em função da concentração (mg L^{-1}) ($0,1$; $0,2$; $0,4$; $0,6$; $0,8$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). ($n=1$).

Determinação dos antibióticos enrofloxacin, ciprofloxacin e norfloxacin em farinha de aves ou penas por extração assistida por micro-ondas (MAE) seguida de cromatografia líquida RPLC-DAD ou HILIC-MS/MS

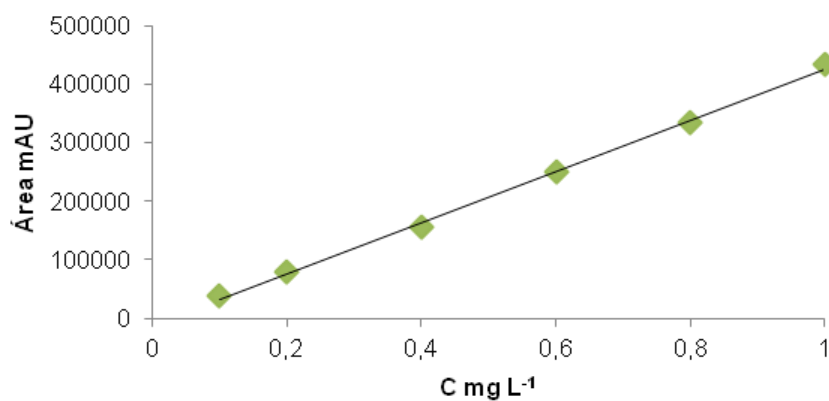


Figura 11 - Reta de calibração da enrofloxacin em farinha de aves em função da concentração (mg L⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).

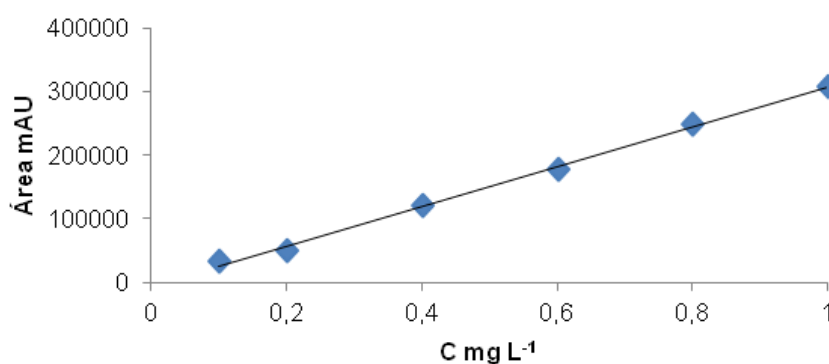


Figura 12 - Reta de calibração da norfloxacin em farinha de penas em função da concentração (mg L⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).

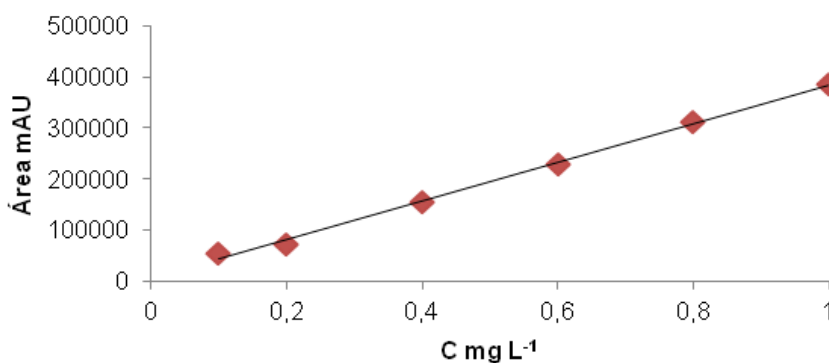


Figura 13 - Reta de calibração da ciprofloxacin em farinha de penas em função da concentração (mg L⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).

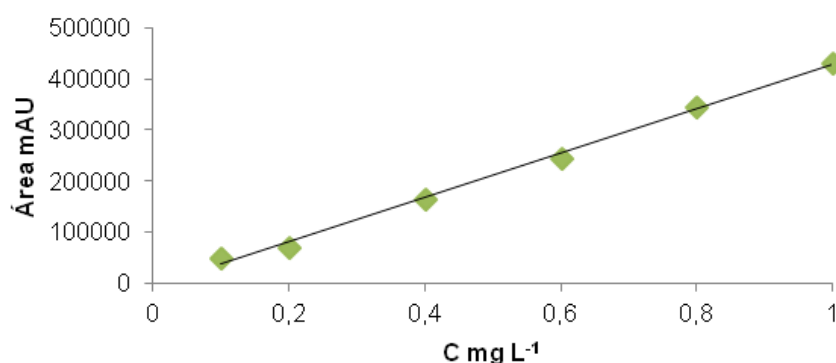


Figura 14 - Retas de calibração da enrofloxacin em farinha de penas em função da concentração (mg L⁻¹) (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹) em fase móvel A (ácido fórmico/água desionizada (99:1 v/v)). (n=1).

A partir das retas de calibração foi possível obter os parâmetros de quantificação – o declive, a ordenada na origem, o coeficiente de correlação e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 – Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para a farinha de aves.

Antibiótico	Declive	Ordenada na origem	Coeficiente de correlação (R ²)	LOD, mg L ⁻¹	LOQ, mg L ⁻¹
Norfloxacin	344351	-2448	0,999	0,1	0,2
Ciprofloxacin	373173	57712	0,999	0,1	0,2
Enrofloxacin	452875	-10014	0,999	0,1	0,2

Tabela 10 – Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para a farinha de penas.

Antibiótico	Declive	Ordenada na origem	Coeficiente de correlação (R ²)	LOD, mg L ⁻¹	LOQ, mg L ⁻¹
Norfloxacin	312764	-5705	0,999	0,1	0,2
Ciprofloxacin	378938	6490	0,999	0,1	0,2
Enrofloxacin	435003	-6505	0,999	0,1	0,2

Os resultados obtidos para as amostras de farinhas que foram dopadas antes da digestão por micro-ondas (Tabelas 9 e 10) foram usados para calcular a percentagem de recuperação dos antibióticos.

A recuperação média dos três antibióticos na farinha de aves analisada foi $66 \pm 10\%$ (NOR), $55 \pm 12\%$ (CIP) e $78 \pm 3\%$ (ENR) ($n=5$) (Figura 15). Para a farinha de penas as recuperações médias obtidas foram $80 \pm 5\%$ (NOR), $74 \pm 5\%$ (CIP) e $87 \pm 7\%$ (ENR) ($n=5$) (Figura 16).

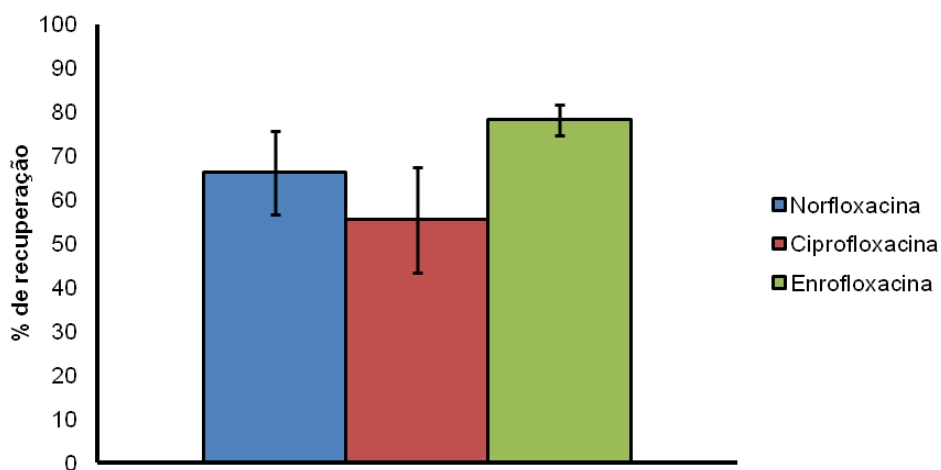


Figura 15 - Percentagens de recuperação de antibióticos obtidas usando farinha de aves dopada com uma concentração de 0,5 mg/kg. Norfloxacin $66 \pm 10\%$; Ciprofloxacin $55 \pm 12\%$ e Enrofloxacin $78 \pm 3\%$. (barras de erro apresentadas ($n=5$)).

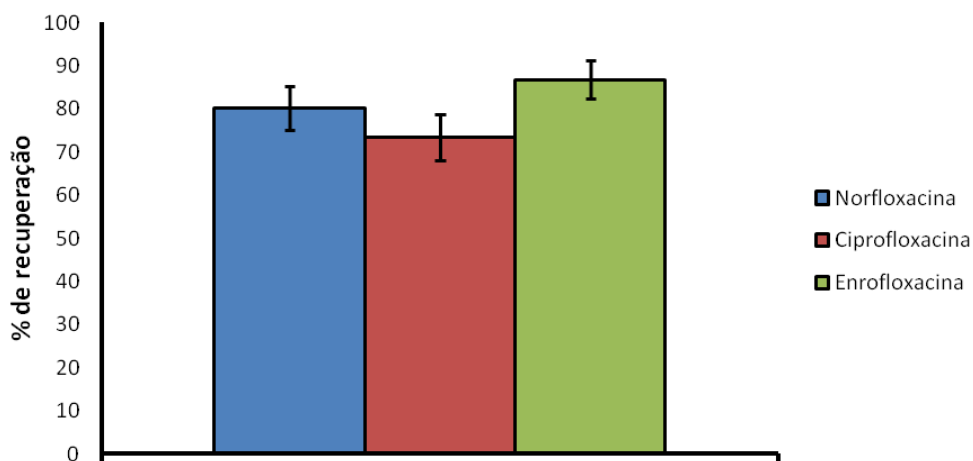


Figura 16 - Percentagens de recuperação de antibióticos obtidas usando farinha de penas dopada com uma concentração de 0,5 mg/kg. Norfloxacin $80 \pm 5\%$; Ciprofloxacin $74 \pm 5\%$ e Enrofloxacin $87 \pm 7\%$. (barras de erro apresentadas ($n=5$)).

Pode-se constatar que os valores obtidos para a enrofloxacin estão compreendidos no intervalo de recuperação normalmente aceite de 80-120%, sendo o presente método apropriado para a quantificação do antibiótico. Nos casos da norfloxacin e ciprofloxacin, contudo, os valores encontrados nem sempre se encontram no intervalo considerado, em particular para a farinha de aves. O facto de o método cromatográfico não resolver totalmente os dois compostos poderá ser parte da razão pela qual as recuperações observadas são mais baixas.

4.2 Cromatografia líquida por interação hidrofílica com detetor DAD

Neste trabalho, o objetivo da utilização deste tipo de cromatografia era eliminar o passo de secagem no final do processo de SPE, de forma a tornar a análise das amostras mais rápida e, eventualmente, mais reprodutível.

Foi selecionada a enrofloxacin para desenvolver este novo método, dado ser o antibiótico com interesse nas matrizes em estudo. Soluções numa gama de concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mg L⁻¹, obtidas por diluição do padrão de enrofloxacin de 50 mg L⁻¹, foram usadas para construir uma reta de calibração. Os resultados obtidos permitiram concluir que a resposta era linear dentro da gama considerada, podendo os parâmetros da reta de calibração ser observados na Tabela 11. Foi possível concluir que as condições em que foram obtidos os resultados eram adequadas para a obtenção de cromatogramas nítidos, com a resolução suficiente para a quantificação do antibiótico.

Tabela 11 – Parâmetros da reta de regressão linear e limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ).

Antibiótico	Declive	Ordenada na origem	Coefficiente de correlação (R ²)	LOD mg L ⁻¹	LOQ mg L ⁻¹
Enrofloxacin	347868	-86346	0,994	0,6	2,0

Para a construção das retas de calibração na matriz de farinha foram utilizadas amostras de farinha digeridas no micro-ondas e, posteriormente, dopadas com enrofloxacin. Contudo, verificou-se que a eluição final na SPE feita com

metanol/ácido fórmico (95:5 v/v) resultava numa acidez da amostra maior do que a apresentada pelas soluções dos padrões preparadas em metanol. Este resultado implicou a não reprodutibilidade do tempo de retenção obtido para os padrões na matriz de farinha.

Efetuada a eluição final na SPE com metanol, foi possível verificar que o efeito associado à acidificação já não se fazia sentir, sendo esta a eluição escolhida para as restantes amostras.

4.3 Cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massa

A otimização das condições de MS/MS, escolha do modo de ionização dos padrões de enrofloxacin e roxitromicina, identificação dos iões e transições mais intensas e a seleção da energia de colisão, mais favoráveis para a análise dos analitos em estudo, foram realizadas através da injeção das soluções padrão de trabalho de enrofloxacin e roxitromicina, preparadas (como descrito anteriormente) a partir de uma solução padrão com concentração de 1 mg L⁻¹.

A ionização por *electrospray* da enrofloxacin produziu iões moleculares protonados ([M+H]⁺) de *m/z* 360,17. Com uma energia de colisão de 35 V as transições 360,17 > 316,18 e 360,17 > 342,16 foram as mais intensas como se pode verificar na Figura 17. A ionização por *electrospray* da roxitromicina produziu iões moleculares protonados ([M+H]⁺) a 837,53, como se pode verificar na Figura 17.

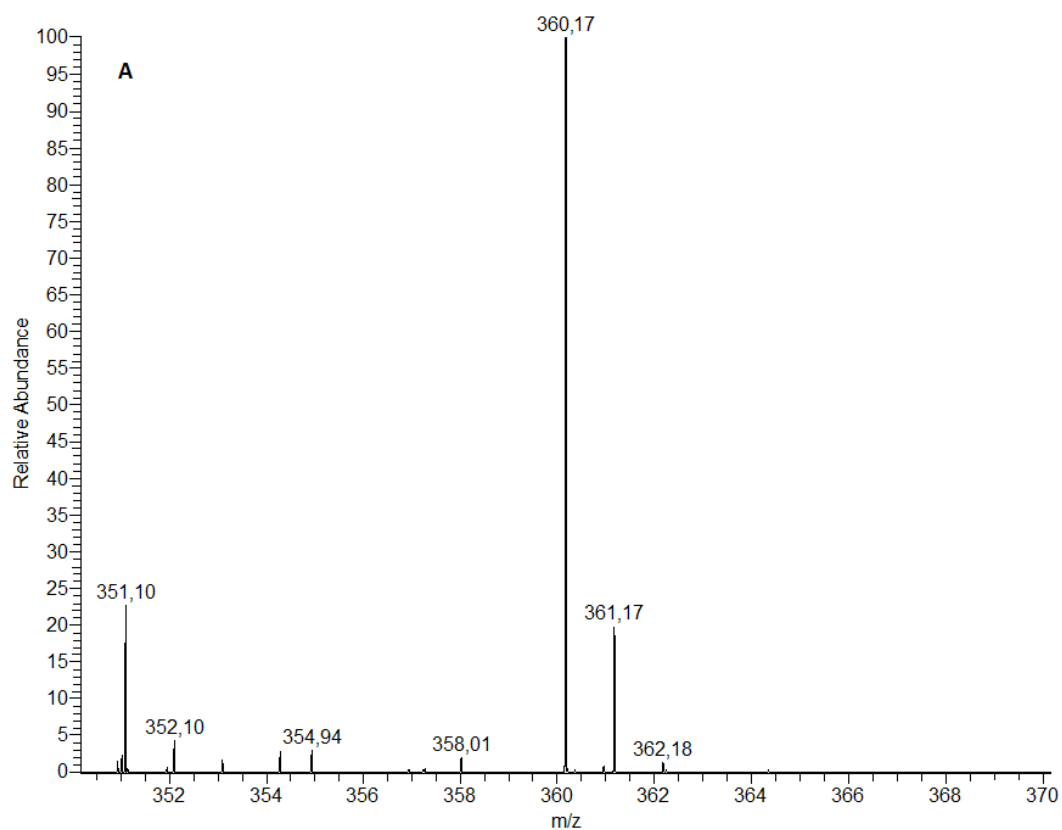


Figura 17 - A: Espectro de massa da enrofloxacin após ionização; B: Espectro de massa da enrofloxacin após fragmentação em modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). C: Espectro de massa do padrão interno, roxitromicina, após ionização.

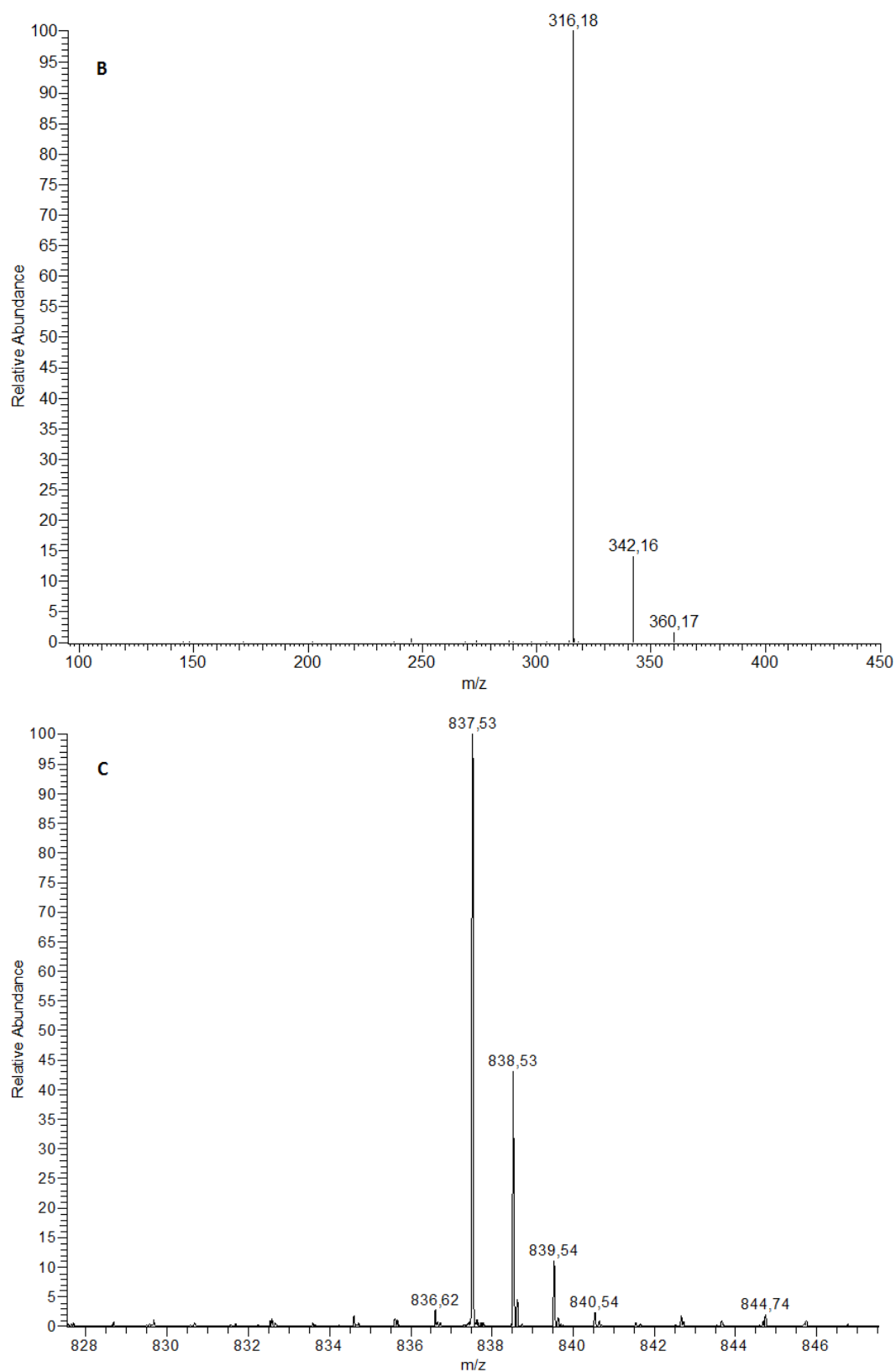


Figura 17 (continuação) - A: Espectro de massa da enrofloxacin após ionização; B: Espectro de massa da enrofloxacin após fragmentação em modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). C: Espectro de massa do padrão interno, roxitromicina, após ionização.

4.3.1 Padrões de antibiótico

Para determinar a gama de linearidade do método, usaram-se soluções padrão de enrofloxacin com concentrações no intervalo 5 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A partir da reta de calibração observou-se a existência de linearidade no intervalo estudado, tendo sido obtido um coeficiente de correlação (R^2) de 0,999. Os parâmetros da reta de regressão linear e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são apresentados na Tabela 12. O antibiótico em estudo, a enrofloxacin, apresentou um tempo de retenção de 2,7 minutos.

Tabela 12 – Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

Antibiótico	Declive	Ordenada na origem	Coefficiente de correlação (R^2)	LOD $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$
Enrofloxacin	7205	42188	0,999	28	95

4.3.2 Padrões de antibiótico em farinha

Para a construção das retas de calibração para a determinação de antibióticos em matriz de farinha foram utilizadas amostras de farinha de aves, dopadas com enrofloxacin após o processo de extração no micro-ondas, com concentrações de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, (Figura 18).

Apresentam-se na Tabela 13 os parâmetros de quantificação da reta de calibração obtida e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).

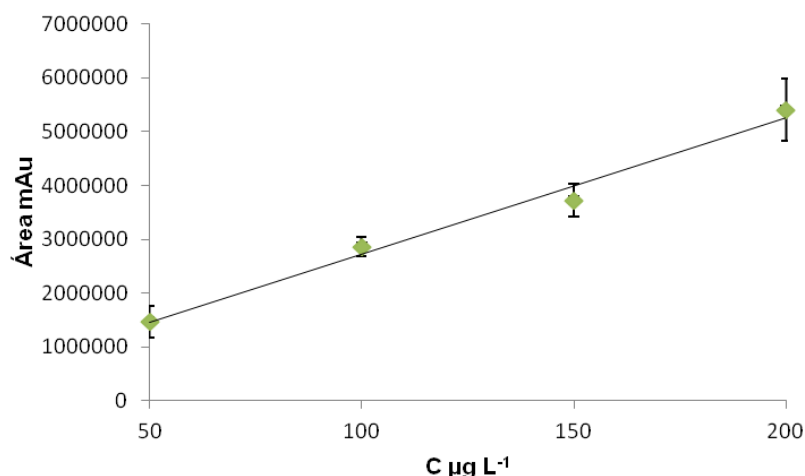


Figura 18 - Reta de calibração para a determinação de enrofloxacin na matriz de farinha de aves (50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) (barras de erro apresentadas (n=5)).

Tabela 13 – Parâmetros da reta de regressão linear e limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) (n=5).

Antibiótico	Declive	Ordenada na origem	Coefficiente de correlação (R^2)	LOD $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$
Enrofloxacin	25315	198668	0,99	28	94

Na Figura 19 pode-se observar os cromatogramas representativos relativos a amostras de farinhas de aves dopadas após o processo de extração por micro-ondas.

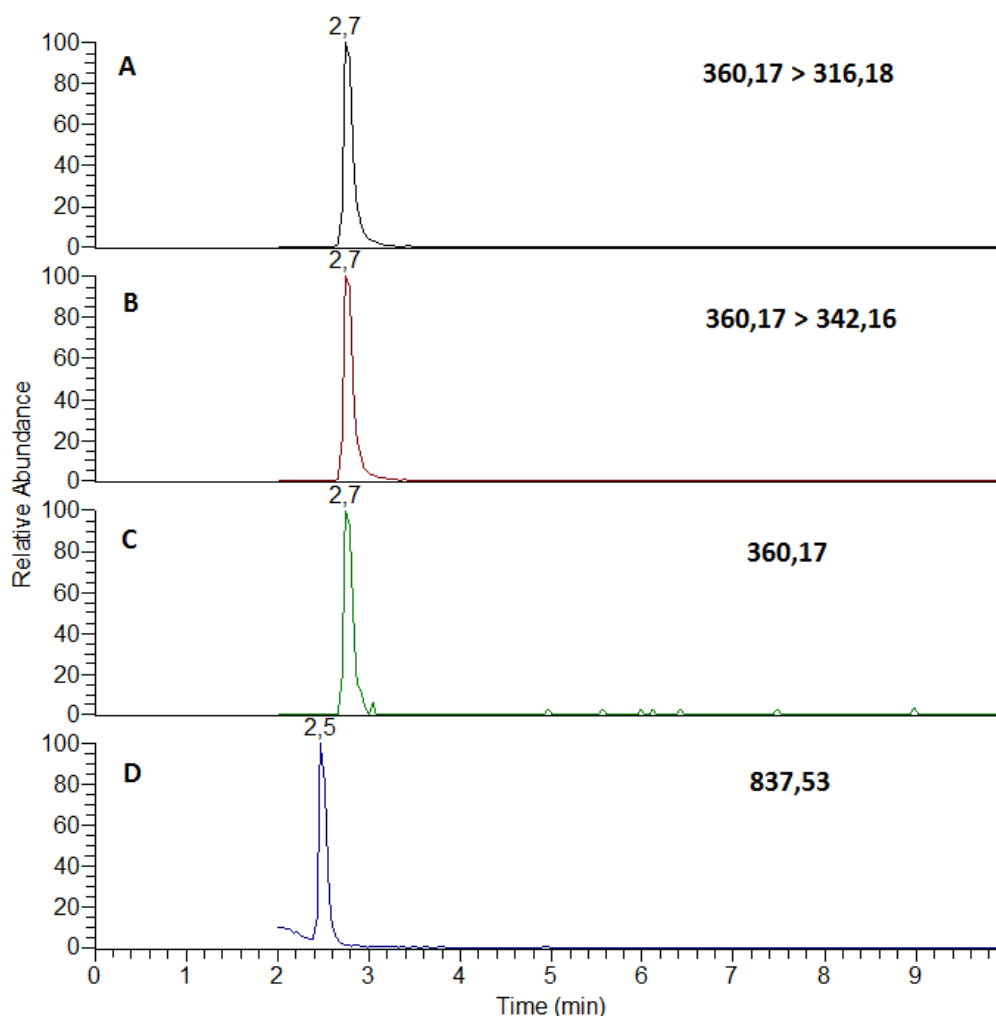


Figura 19 - Cromatogramas de um extrato de farinha de aves dopado, após o processo de extração, com $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de enrofloxacin.

A confirmação da presença da enrofloxacin é assegurada pelo espectros de massa nos quais se verificam as transições $360,17 > 316,18$ e $360,17 > 342,16$, para além do ião parental $360,17$. A quantificação da enrofloxacin foi feita recorrendo ao ião de m/z $316,18$.

4.3.3 Exatidão e precisão

A exatidão de um método analítico expressa o grau de concordância entre o valor verdadeiro e o valor encontrado. A exatidão pode ser aferida pela percentagem de recuperação ou pelo *bias* (EMEA, 2012).

Precisão é a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A forma mais comum de expressar a precisão é através da repetibilidade e da reprodutibilidade. Geralmente a precisão é aferida pelo desvio-padrão e pelo coeficiente de variação (EMEA, 2012).

O estudo da exatidão e da precisão foi realizado através da avaliação de quatro níveis de dopagem: 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A exatidão foi avaliada tendo em conta as percentagens de recuperação obtidas. A avaliação da precisão foi feita usando o coeficiente de variação.

Verifica-se que relativamente à exatidão do método, aquando da dopagem das amostras de farinha de aves após o processo de extração, foram obtidas percentagens de recuperação de cerca de 100% para todos os níveis de concentração (Tabela 14). Quanto à precisão do método, constata-se na Tabela 14 que o valor do coeficiente de variação (CV) é inferior a 15% para os quatro níveis de concentração (50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), cumprindo o requisito do guia de validação da *European Medicines Agency*, 15%, revelando que o método é preciso.

Tabela 14 – Exatidão e precisão para quatro níveis de concentração de enrofloxacin, com dopagem depois do processo de extração.

Nível de concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Média de recuperação % (n=5)	Coeficiente de variação (CV) %
50	90	6
100	105	7
150	93	9
200	98	3

Na Tabela 15, verifica-se que relativamente à exatidão do método aquando da dopagem da farinha de aves antes do processo de extração, foi obtida uma recuperação não aceitável para a concentração mais baixa, 50 µg L⁻¹, cerca de 19%. Relativamente à concentração de 100 µg L⁻¹ verifica-se que a percentagem de recuperação é aceitável, sendo contudo um pouco baixa, recuperando-se cerca de metade do que se administra antes do processo de extração. Para o nível de concentração de 150 µg L⁻¹ e 200 µg L⁻¹, obteve-se recuperações da ordem dos 100%. Conclui-se que o método é pouco exato para concentrações abaixo dos 100 µg L⁻¹.

Em relação à precisão do método para amostras de farinha de aves dopadas antes do processo de extração da matriz, verifica-se (Tabela 15) que os valores do coeficiente de variação são inferiores ao limite estipulado no guia de validação, 15%, excetuando para a concentração de 100 µg L⁻¹, concluindo-se que o método é preciso para este tipo de amostras.

Tabela 15 – Exatidão e precisão para quatro níveis de concentração de enrofloxacin, com dopagem antes do processo de extração.

Nível de concentração µg L ⁻¹	Média de recuperação % (n=5)	Coeficiente de variação (CV) %
50	19	11
100	56	18
150	103	13
200	121	14

Após a análise de todos os resultados relativos à recuperação do antibiótico enrofloxacin na matriz de farinha de aves, foi calculada a concentração do antibiótico expressa em massa de antibiótico por massa de farinha (µg/kg) nos extratos de farinha analisados. Verificou-se que o valor mais baixo de concentração de antibiótico administrado à matriz de farinha de aves para o qual se obtém uma taxa de recuperação aceitável e que permite a sua quantificação é de 37 µg/kg. Assim, o limite de quantificação do método cromatográfico desenvolvido e aplicado é de 37 µg/kg de antibiótico enrofloxacin em farinha de aves. O método cromatográfico desenvolvido apesar de não permitir quantificações do antibiótico enrofloxacin na matriz de farinha de aves abaixo dos 37 µg/kg, permite a confirmação segura da presença do antibiótico na matriz de farinha.

4.3.4 Análise das amostras de farinha

Analísaram-se cromatograficamente seis amostras de extrato de farinha de aves, submetida ao processo de extração global, como foi descrito anteriormente, sem qualquer dopagem. Após a análise dos espectros de massa e cromatogramas obtidos (Fig. 20), constatou-se a presença do antibiótico enrofloxacin, dado que nesses mesmos espectros de massa se observaram as transições 360,17 > 316,18 e 360,17 > 342,16.

Apesar de se confirmar a presença da enrofloxacin nas amostras de farinha de aves, não é possível a sua quantificação, dado que o nível de concentração no qual o antibiótico está presente se situa abaixo do limite de quantificação do método.

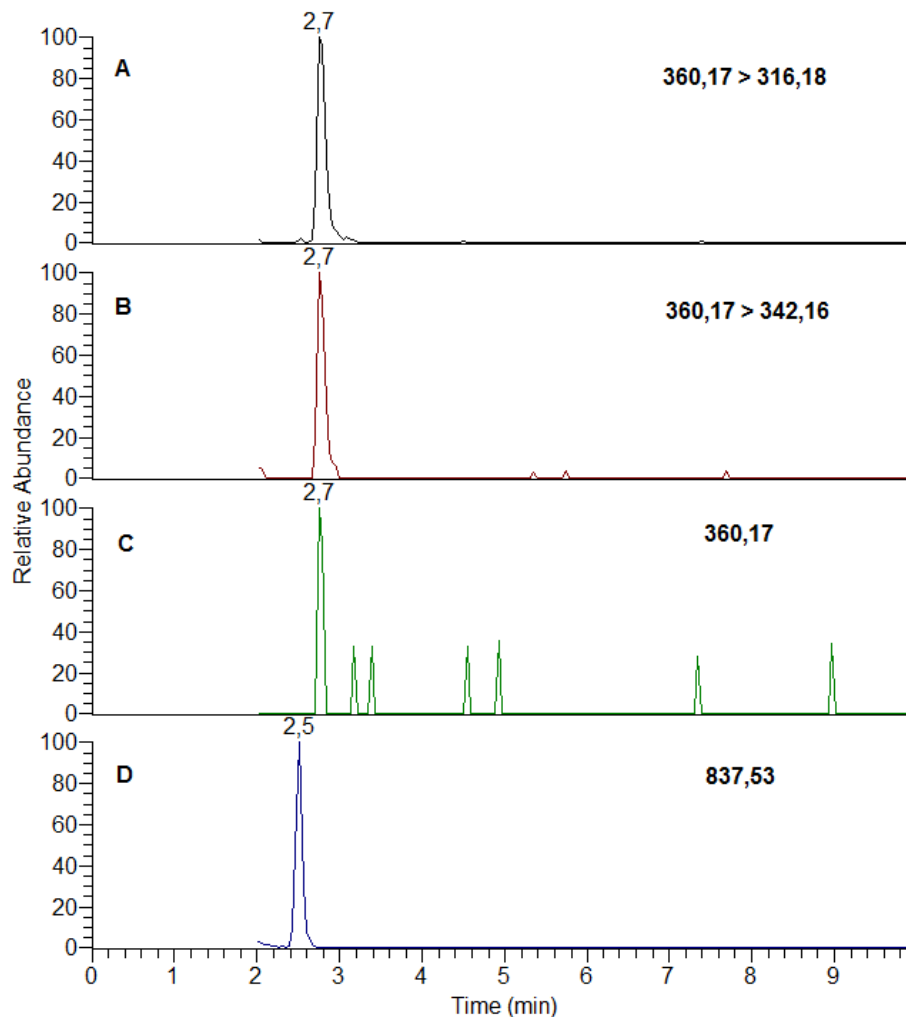


Figura 20 - Cromatogramas de um extrato de farinha de aves não dopado antes do processo de extração.

A validação de um método analítico é definida pelo conjunto de todos os procedimentos necessários para demonstrar que um determinado método, desenvolvido para identificar e quantificar um composto em determinada matriz, é suficientemente fiável para se obterem resultados com elevado grau de confiança. Um protocolo geral de validação engloba a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de deteção e quantificação, exatidão e precisão (EMEA, 2012).

O presente método não se encontra completamente validado pois não foram cumpridos alguns requisitos, tais como a existência de extratos de matriz brancos (extratos de farinha nos quais não se verificasse a presença do antibiótico), ou a avaliação da reprodutibilidade e repetibilidade do método ao longo tempo.

Mesmo assim, o método desenvolvido permite obter a confirmação da presença ou não do antibiótico, na matriz de farinha analisada e permite a quantificação do antibiótico enrofloxacin, em amostras de farinhas de aves, com concentrações acima de 37 µg/kg, ou seja, abaixo do intervalo dos limites legais permitidos pela UE para a presença de enrofloxacin em alguns tecidos animais, sendo um processo rápido e de baixo custo. Este método, revelou-se assim um método analítico útil para a análise de enrofloxacin neste tipo de matrizes muito complexas.

5. Conclusão e perspetivas futuras

Os estudos realizados permitem concluir que os métodos de limpeza e extração de componentes otimizados, MAE e SPE, seriam adequados para a posterior deteção e quantificação dos antibióticos em estudo, permitindo uma eficaz extração e pré-concentração dos mesmos.

As condições de determinação previamente otimizadas utilizando padrões dos antibióticos, sem matriz de farinha, foram, posteriormente, aplicadas às matrizes de farinha de aves e penas, de modo a verificar se as condições previamente estabelecidas seriam adequadas para a quantificação dos antibióticos nas matrizes.

Por utilização de cromatografia líquida de fase reversa com detetor DAD, para deteção e quantificação dos antibióticos obtiveram-se taxas de recuperação, para a

farinha de aves, de $66 \pm 10\%$ para a norfloxacin, $55 \pm 12\%$ para a ciprofloxacin e $78 \pm 3\%$ para a enrofloxacin. Quanto à farinha de penas, as taxas de recuperação foram de $80 \pm 5\%$ para a norfloxacin, $74 \pm 5\%$ para a ciprofloxacin e 87 ± 7 para a enrofloxacin. Os valores obtidos para a enrofloxacin estão compreendidos no intervalo de recuperação normalmente aceite de 80-120%, sendo o presente método apropriado para a quantificação do antibiótico. Nos casos da norfloxacin e ciprofloxacin, contudo, o método cromatográfico não permite resolver totalmente os dois compostos. Algumas variáveis inerentes ao método deverão, em trabalho futuro, ser variadas de modo a alcançar condições mais adequadas para determinação simultânea dos antibióticos norfloxacin e ciprofloxacin.

O método cromatográfico demonstrou ser rápido e de baixo custo, embora não apropriado para monitorizar os baixos níveis do antibiótico legislados.

Recorrendo a cromatografia líquida por interação hidrofílica acoplada a espectrometria de massa, verificou-se melhorias em diversos parâmetros como o tempo de análise, resolução dos cromatogramas e limites de quantificação. O método cromatográfico desenvolvido permitiu obter boas taxas de recuperação de enrofloxacin (antibiótico de interesse neste tipo de farinhas) aquando da dopagem dos extratos após o processo de extração. Contudo, quando a farinha foi dopada e, posteriormente, submetida ao processo de extração, as taxas de recuperação para concentrações de enrofloxacin abaixo dos $37 \mu\text{g/kg}$ diminuíam substancialmente. Sendo assim, o método cromatográfico desenvolvido permite quantificar o antibiótico enrofloxacin numa concentração acima de $37 \mu\text{g/kg}$, valor que se situa abaixo do intervalo permitido pela UE para os limites legais permitidos para a presença de enrofloxacin em alguns tecidos animais. Note-se ainda que as farinhas são desidratadas e, conseqüentemente, o nível de concentração de antibióticos nelas eventualmente presentes deverá ser mais alto do que aquele nos produtos de origem animal a partir dos quais são feitas.

Tendo em conta o objetivo do trabalho, convém realçar a importância da monitorização contínua de antibióticos em produtos de origem animal e a necessidade de continuarem a ser desenvolvidos processos de determinação de antibióticos que permitam a respetiva deteção a níveis muito baixos.

6. Referências Bibliográficas

Abu-Samra A., Morris J. S., Koirtzmann S. R., **1975** Wet ashing of some biological samples in a microwave oven, *Analytical Chemistry*, 47, 1475-1477.

Alpert A. J., **1990** Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *Journal of Chromatography*, 499, 17-196.

Ball P., **2000** Quinolone generations: natural history or natural selection, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 17-24.

Boxall A. B. A., Fogg L. A., Kay P., Blackwell P. A., Pemberton E. J. and Croxford A., **2003** Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment, *Toxicol Lett*, 142, 207–218.

Bragonzi A., **2010** Fighting Back: Peptidomimetics as a New Weapon in the Battle Against Antibiotic Resistance, *Science Translational Medicine*, 2, 21, 21ps9.

Bruno L. B., Gaud P., Jean-Philippe A., **2009** Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, 8016–8034.

Canesqui, A. M., **2003** Os estudos de antropologia da saúde/doença no Brasil na década de 1990, *Ciência & Saúde Coletiva*, 8, 109-124.

Cavenati S., Carvalho P. N., Almeida C. M. R., Basto M., Vasconcelos M., **2012** Simultaneous determination of several veterinary pharmaceuticals in effluents from urban, livestock and slaughterhouse wastewater treatment plants using a simple chromatographic method, *Water Science & Technology*, 66.

Chen L. F., Chopra T., Kaye K. S., **2011** Pathogens Resistant to Antibacterial Agents, *Medical Clinics of North America*, 95, 4, 647-676.

Costa A., **2004** Desenvolvimento de métodos de extracção por micro-ondas para pesticidas em solos, *Estágio Prodep*, Instituto Superior de Engenharia do Porto.

Dalhoff A., **2012** Global Fluorquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1-37.

Decreto Lei nº 151/2005 de 30 de Agosto. *Diário da República nº 166 - I Série A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Directiva nº 96/22/CE do Conselho Europeu, 29 de Abril de 1996. *Diário da República nº 212 - I Série A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

EMA, **2002** – Maximum Residue Levels 820/02. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin (extension to all food producing species). Summary report 3.

EMA, **2005** – The rules governing medicinal products in European Union. Establishment of maximum residue limits (MRLs) for residue of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.

EMA/CVMP/SAGAM/184651/2005, **2007** – Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP), public statement on the use of (fluoro)quinolones in food producing animals in the European Union: Development on resistance and impact on Human and animal health.

EMA, **2012** – Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).

Gentili A., Perret D., Marchese S., **2005** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 7.

Ihrke P., Papich M., Demanuelle T. C., **1999** The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology, *Veterinary Dermatology*, 10, 193–204.

Jornal Oficial da União Europeia, C299, 11 de Dezembro 2007.

Kahsay G., Song H., Schepdael V. A., Cabooter D., Adams E., **2014** Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 142– 154.

Kresge N., Simoni R. D. and Hill R. L., **2004** Selman Waksman: the Father of Antibiotics, *Journal of Biological Chemistry*, 279, e7.

Li W. C., **2014** Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environmental Pollution*, 187, 193-201.

Ligon B. L., **2004** Penicillin: its discovery and early development, *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, 52-57.

Lizondo M., Pons, M., Gallardo, M., Estelrich, J., **1997** Physicochemical properties of Enrofloxacin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 15, 1845-1849.

Locatelli M., Lutiis F., Carlucci G., **2013** High performance liquid chromatography determination of prulifloxacin and five related impurities in pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 78–79, 27–33.

Machado J., Oliveira A., Antonio N., Canesini R., Rocha J., Negri D., **2009** Quinolonas: Revisão de Literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, 12, 1679-7353.

Makarov A. and Scigelova M., **2010** Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217, 3938–3945.

Martinez M., McDermott P., Walker R., **2006** Pharmacology of the fluorquinolones: A perspective for the use in domestic animals, *The Veterinary Journal*, 172, 1, 10-28.

Montero M. T., Freixas J., Hernández-Borrell J., **1997** Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones, *International Journal of Pharmaceutics*, 149, 161-170.

Ovando H., Gorla N., Biol DR., Weyers A., Ugnia V., Magnoli V., **2004** Simultaneous quantification of ciprofloxacin, enrofloxacin and balofloxacin in broiler chicken muscle, *Vet.XXXVI*, 1.

Park H. R., Chung K. Y., Lee H. C, Lee J. K, Bark K. M., **2000** Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 21, 9, 849-854.

Park H. R., Kim T. H., Bark K. M., **2002** Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37, 443-460.

Poole C. F., Gunatilleka A. D., Sethuraman R., **2000** Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A* , 885, 17–39.

Regulamento (2377/90/CE) do Conselho Europeu, 26 de Junho de 1990. *Jornal Oficial da União Europeia*. A Comissão Europeia. Bruxelas.

Regulamento (UE) n.º 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009. *Jornal Oficial da União Europeia*. A Comissão Europeia. Bruxelas.

Relatório técnico conjunto CEPD/EMA. "O desafio bacteriano: é tempo de reagir", disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf

Salehzadeh F., Salehzadeh A., Rokni N., Madani R., Golchinefar F., **2007** Enrofloxacin in Chicken Tissues Tehran Slaughterhouses in Iran, *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 4.

Sarmah A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A., **2006** A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere*, 65, 5, 725-759.

Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T. R., **2001** Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 431–437.

Sharma P., Ankit J., Sandeep J., **2009** Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects, *Polish Pharmacological Society*, 66, 6, 587-604.

Song C., Ryu H., Park J., Ko T., **1999** Mechanism of DNA Gyrase inhibition by quinolones: I. Spectral analysis for nalidixic acid polymorphism, *Korean Chemical Society*, 20, 6, 727-730.

Speltini A., Sturini M., Maraschi F., Profumo A., Albini A., **2011** Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices, *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 8.

Stolker A. A. M. and Brinkman U. A. Th., **2005** Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review, 1067, 15-53.

Sun L. and Lee H. K., **2002** Microwave-assisted extraction behaviour of non-polar and polar pollutants in soil with analysis by high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.*, 25, 67-76.

Supelco, 1998, Guide to Solid Phase Extraction – Bulletin 910, Sigma-Aldrich Co.

Tavares W., *Antibióticos e quimioterápicos para o clínico*, Editora Ateneu, 1216, **2009**.

Teixeira, **2008** Consumo de Antimicrobianos em Portugal - Dia Europeu dos Antibióticos, *Observatório do Medicamento e Produtos de Saúde*, INFARMED, Lisboa

Varley A. J., Sule J., Absalom A. R., **2009** Principles of antibiotic therapy. Continuing Education in Anaesthesia, *Critical Care & Pain*, 9, 6, 184-188.

Walsh C., **2000** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance, *Nature*, 406, 6797, 775-781.

Walsh C., Timothy A. W., **2014** Prospects for new antibiotics: a molecule centered perspective, *Journal of Antibiotics*, 67, 1, 7-22.

Winefordner J. D., **2003** Sample Preparation Techniques In Analytical Chemistry, *Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons, Inc.*, 162

Wise R., **2002** Antimicrobial resistance: priorities for action, *J. Antimicrob. Chemoth.*, 49, 585-586.

Wright D. H., Brown G. H., Peterson M. L., Rotschafer J. C., **2000** Application of fluorquinolone pharmacodynamics, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 669-683.

Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Melis M., Fanelli R., **2010** Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment, *Journal of Hazardous Materials*, 179, 1, 1042-1048.